illumina®

Guía del usuario del sistema HiSeq® 2500

PARA USO DE INVESTIGACIÓN SOLAMENTE

PROPIEDAD DE ILLUMINA
N.º componente 15035786 Rev. D ESP
Noviembre de 2014

N.º de catálogo SY-401-9001DOC

Personalice una breve guía de flujo de trabajo integral con la herramienta de selección de protocolos personalizados
support.illumina.com/custom-protocol-selector.html

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina"), y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes con relación al uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, derechos de autor ni consuetudinarios ni derechos de terceros similares.

La licencia del software se otorga bajos los términos y condiciones del Acuerdo de licencia del software de secuenciación de Illumina en un documento separado. Si no está de acuerdo con los términos y condiciones que figuran en dicho acuerdo, Illumina no le otorgará la licencia del software y no podrá utilizar ni instalar el software.

Para garantizar el uso correcto y seguro de los productos aquí descritos, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir sus instrucciones de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEEN COMPLETAMENTE NI SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES AQUÍ CONTENIDAS, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN LOS PRODUCTOS, LESIONES EN PERSONAS (USUARIOS O TERCEROS) Y DAÑOS EN OTRA PROPIEDAD.

ILLUMINA NO ASUME NINGUNA RESPONSABILIDAD QUE SE DERIVE DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE) NI DEL USO DE DICHOS PRODUCTOS FUERA DEL ÁMBITO DE LAS LICENCIAS EXPRESAS ESCRITAS O LOS PERMISOS OTORGADOS POR ILLUMINA EN RELACIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE DICHOS PRODUCTOS POR PARTE DE LOS CLIENTES.

PARA USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN

© 2012–2014 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina, **24sure**, **BaseSpace**, **BeadArray**, **BlueFish**, **BlueFuse**, **BlueGnome**, **cBot**, **CSPro**, **CytoChip**, **DesignStudio**, **Epicentre**, **GAIIx**, **Genetic Energy**, **Genome Analyzer**, **GenomeStudio**, **GoldenGate**, **HiScan**, **HiSeq**, **HiSeq X**, **Infinium**, **iScan**, **iSelect**, **ForenSeq**, **MiSeq**, **MiSeqDx**, **MiSeq FGx**, **NeoPrep**, **Nextera**, **NextBio**, **NextSeq**, **Powered by Illumina**, **SeqMonitor**, **SureMDA**, **TruGenome**, **TruSeq**, **TruSight**, **Understand Your Genome**, **UYG**, **VeraCode**, **verifi**, **VeriSeq**, el color naranja calabaza y el diseño de las bases de streaming son marcas comerciales de Illumina, Inc. o de sus filiales en EE. UU. u otros países. Todos los demás nombres, logotipos y marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

Este software contiene la biblioteca de SeqAn, cuya licencia se otorga a Illumina y se distribuye bajo la siguiente licencia:

Copyright © 2010, Knut Reinert, FU Berlin. Todos los derechos reservados. La redistribución y el uso en formatos de fuente y binarios, con o sin modificación, se permite siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

1 Las redistribuciones del código de fuente deben observar la nota de copyright anterior, esta lista de condiciones y la siguiente exención de responsabilidad.

2 Las redistribuciones en formato binario deben reproducir la nota de copyright anterior, esta lista de condiciones y la siguiente exención de responsabilidad de la documentación o de otros materiales que suministre el distribuidor.

3 Ni el nombre de FU Berlin o Knut Reinert ni los nombres de sus contribuidores puede utilizarse para divulgar o promocionar productos derivados de este software sin permiso expreso previo y por escrito.

ESTE SOFTWARE LO SUMINISTRAN LOS PROPIETARIOS DE LOS DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL Y SUS CONTRIBUIDORES "TAL CUAL" Y SE RESCINDE DE CUALQUIER GARANTÍA EXPRESA O IMPLÍCITA INCLUIDAS, ENTRE OTRAS, LAS GARANTÍAS IMPLÍCITAS DE COMERCIABILIDAD E IDONEIDAD PARA UN FIN PARTICULAR. EN NINGÚN CASO EL PROPIETARIO DE LOS DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL O SUS CONTRIBUIDORES SERÁN RESPONSABLES DE NINGÚN DAÑO DIRECTO, INDIRECTO, ACCIDENTAL, ESPECIAL, EJEMPLAR O CONSECUENTE (INCLUIDO, ENTRE OTROS, LA ADQUISICIÓN DE BIENES O SERVICIOS SUSTITUTOS, LA PÉRDIDA DE USO, DATOS O BENEFICIOS O LA INTERRUPCIÓN DE ACTIVIDAD COMERCIAL), CUALQUIERA QUE SEA LA CAUSA Y PARTIENDO DE LA POSIBILIDAD DE RESPONSABILIDADES, YA SEA EN CONTRATO, RESPONSABILIDAD OBJETIVA O

AGRAVIO (INCLUIDA LA NEGLIGENCIA U OTRO TIPO) QUE SURJAN DE ALGÚN MODO DEL USO DE ESTE SOFTWARE, INCLUSO SI HUBIEREN SIDO ADVERTIDOS DE LA POSIBILIDAD DE TALES DAÑOS.

Leer antes de usar este producto

Este producto, y su uso y disposición, están sujetos a los siguientes términos y condiciones. Si el comprador no acepta estos términos y condiciones, el comprador no contará con la autorización de Illumina para utilizar este producto, y no deberá utilizar este producto.

1 **Definiciones**. "**PI de aplicaciones específicas**" hace referencia a los derechos de propiedad intelectual que controla o posee Illumina que pertenecen a este producto (y al uso del mismo) solo en relación con aplicaciones específicas o campos específicos. La PI de aplicaciones específicas excluye la propiedad intelectual que controla o posee Illumina que cubre los aspectos o las características de este producto (o el uso del mismo) que son comunes a este producto en todas las posibles aplicaciones y todos los posibles campos de uso (la "**PI común**"). La PI de aplicaciones específicas y la PI común son subconjuntos separados y no superpuestos de todos los derechos de propiedad intelectual que controla o posee Illumina. A modo de ejemplo, pero sin limitarse a este, los derechos de propiedad intelectual de Illumina sobre métodos diagnósticos específicos, métodos forenses específicos o biomarcadores de ácido nucleico, secuencias o combinaciones de biomarcadores o secuencias específicas son ejemplos de una PI de aplicaciones específicas. "**Consumibles**" hacen referencia a los elementos fungibles y los reactivos de marca Illumina que ha concebido Illumina para su uso junto con el hardware, así como para su consumo mediante el uso del hardware. "**Documentación**" comprende el manual del usuario de Illumina correspondiente a este producto, incluido, entre otros, los prospectos y cualquier otro tipo de documentación que se adjunte a este producto, al que el producto haga referencia o que se encuentre en el embalaje vigentes en la fecha de envío de Illumina. La documentación incluye este documento. "**Hardware**" engloba los instrumentos, accesorios o periféricos de marca Illumina. "**Illumina**" hace referencia a Illumina, Inc. o a un afiliado de Illumina, según corresponda. "**Producto**" comprende el producto al que se adjunta este documento (por ejemplo, hardware, consumibles o software). "**Comprador**" es la persona o entidad que adquiere de manera legal y correcta este producto de Illumina o de un distribuidor autorizado de Illumina. "**Software**" hace referencia al software de marca Illumina (por ejemplo, el software que opera el hardware o el software de análisis de datos). Todo el software se concede mediante licencia y no se vende, al tiempo que puede estar sujeto a términos adicionales que figuren en el acuerdo de licencia del usuario final del software. "**Especificaciones**" incluye las especificaciones escritas de Illumina con respecto a este producto vigentes en la fecha de envío del producto por parte de Illumina.

2 **Derechos para uso exclusivo en investigación**. De conformidad con estos términos y condiciones y, a menos que se acuerde lo contrario por escrito con un directivo de Illumina, al comprador solo se le concede un derecho no exclusivo, no transferible, personal y sin posibilidad de sublicencia de acuerdo con la PI común de Illumina, en vigor en la fecha de envío de este producto por parte de Illumina, con el único fin de utilizar este producto en las instalaciones del comprador para los fines de investigación interna de este (que incluye los servicios de investigación prestados a terceros) y solo conforme a la documentación de este producto, **pero queda excluido de manera específica cualquier uso que** (a) requiriera derechos o una licencia por parte de Illumina sobre una PI de aplicaciones específicas, (b) constituya un nuevo uso de un consumible utilizado previamente, (c) constituya el desmontaje, la ingeniería inversa, la compilación inversa o el montaje inverso de este producto, (d) constituya la separación, la extracción o el aislamiento de los componentes de este producto o de otros análisis no autorizados de este producto, (e) conceda acceso a los métodos de funcionamiento de este producto o determine dichos métodos, (f) constituya el uso de consumibles o reactivos que no sean de Illumina con el hardware de Illumina (no se aplica si las especificaciones o la documentación disponen lo contrario), o bien (g) constituya la transferencia a un tercero, o la sublicencia, del software o cualquier software de terceros. Todo el software, ya se proporcione por separado, se instale o se incorpore en un producto, se otorga en forma de licencia al comprador y no se vende. Salvo que se estipule de manera expresa en esta sección, ningún derecho ni ninguna licencia de los derechos de propiedad intelectual de Illumina se otorgan de manera expresa, implícita o por impedimento legal (doctrina de los actos propios).

El comprador solo será responsable de determinar si el comprador posee todos los derechos de propiedad intelectual necesarios para los usos previstos de este producto por parte del comprador, incluidos entre otros, cualquier derecho de terceros o derechos en relación con la PI de aplicaciones específicas. Illumina no garantiza que los usos previstos específicos del comprador no infrinjan los derechos de propiedad intelectual de un tercero o de una PI de aplicaciones específicas.

3 **Cumplimiento normativo**. Este producto no se ha aprobado, autorizado ni se le ha otorgado licencia alguna por parte de la Food and Drug Administration (FDA) de EE. UU. o de cualquier otra entidad regulatoria, ya sea extranjera o nacional, para ningún uso previsto específico, bien para su uso en investigación, uso comercial, uso diagnóstico o de cualquier otro tipo. Este producto contiene la etiqueta Para uso exclusivo en investigación. El comprador debe asegurarse de que cuenta con todas las aprobaciones regulatorias pertinentes para los usos previstos de este producto por parte del comprador.

4 **Usos no autorizados**. El comprador acepta: (a) utilizar cada consumible solo una vez, y (b) utilizar solo consumibles o reactivos de Illumina con el hardware de Illumina. Las limitaciones en (a) y (b) no se aplican si la documentación o las especificaciones de este producto disponen lo contrario. El comprador acepta no involucrarse en ninguna de las siguientes actividades, ni tampoco autoriza a ningún tercero a involucrarse en ninguna de las mismas: (i) desmontar, llevar a cabo actos de ingeniería inversa, compilación inversa o montaje inverso del producto, (ii) separar, extraer o aislar componentes de este producto, o bien someter a este producto o a sus componentes a cualquier análisis que no se haya autorizado expresamente en la documentación de este producto, (iii) otorgar acceso a los métodos de funcionamiento de este producto o intentar determinarlos, o bien (iv) transferir a un tercero, o conceder una sublicencia, en relación con cualquier software o cualquier software de terceros. Además, el comprador acepta que el contenido y los métodos de funcionamiento de este producto son propiedad de Illumina y que este producto contiene o incluye secretos de mercado de Illumina. Las condiciones y restricciones que figuran en estos términos y condiciones se negocian como condiciones de venta y, por tanto, controlan la venta de este producto, así como su uso por parte del comprador.

5 **Limitación de responsabilidades. EN LA MEDIDA EN QUE LO PERMITA LA LEY, EN NINGÚN CASO SE CONSIDERARÁ RESPONSABLE A ILLUMINA NI A SUS PROVEEDORES EN RELACIÓN CON EL COMPRADOR O CUALQUIER TERCERO DE LOS COSTES DE GESTIÓN DE SUSTITUCIÓN DE PRODUCTOS O SERVICIOS, DE LA PÉRDIDA DE BENEFICIOS, DATOS U OPERACIONES COMERCIALES, NI DE NINGÚN DAÑO INDIRECTO, ESPECIAL, ACCIDENTAL, EJEMPLAR, CONSECUENTE O PUNITIVO DE NINGÚN TIPO DERIVADO DE O RELACIONADO CON, ENTRE OTROS, LA VENTA DE ESTE PRODUCTO, SU USO, EL CUMPLIMIENTO DE ILLUMINA DE LA PRESENTE NI DE CUALQUIERA DE ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, YA SE DERIVEN O PROCEDAN DE CUALQUIER PRINCIPIO DE RESPONSABILIDAD (BIEN POR CONTRATO, DELITO [INCLUIDA LA NEGLIGENCIA], RESPONSABILIDAD ESTRICTA O CUALQUIER OTRO TIPO DE RESPONSABILIDAD).**

6 **LA RESPONSABILIDAD TOTAL Y ACUMULATIVA DE ILLUMINA CON RESPECTO AL COMPRADOR O CUALQUIER TERCERO DERIVADA DE, O EN RELACIÓN CON, ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, INCLUIDOS, ENTRE OTROS, ESTE PRODUCTO (INCLUIDO EL USO DEL MISMO) Y EL CUMPLIMIENTO DE ILLUMINA CONFORME A LA PRESENTE, YA SEA POR CONTRATO, DELITO (INCLUIDA LA NEGLIGENCIA), RESPONSABILIDAD ESTRICTA O CUALQUIER OTRO TIPO DE RESPONSABILIDAD, NO SUPERARÁ EN NINGÚN CASO LA CANTIDAD PAGADA A ILLUMINA POR ESTE PRODUCTO.**

7 **Limitaciones sobre las garantías concedidas por Illumina. EN LA MEDIDA QUE LO PERMITA LA LEY Y SUJETO A LA GARANTÍA EXPRESA DEL PRODUCTO QUE FIGURA EN ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, ILLUMINA NO OTORGA NINGUNA GARANTÍA (Y RENUNCIA DE MANERA EXPRESA A CUALQUIER GARANTÍA), YA SEA EXPRESA, IMPLÍCITA O LEGAL, EN RELACIÓN CON ESTE PRODUCTO, INCLUIDAS ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA IMPLÍCITA DE COMERCIALIZACIÓN, IDONEIDAD PARA UN PROPÓSITO PARTICULAR, DE NO INFRACCIÓN O DERIVADA DE UN RENDIMIENTO, ACUERDO, USO O TRANSACCIÓN COMERCIAL. SIN LIMITAR LA GENERALIDAD DE LO DISPUESTO**

ANTERIORMENTE, ILLUMINA NO AFIRMA, REPRESENTA NI GARANTIZA DE NINGUNA MANERA LA UTILIDAD DE ESTE PRODUCTO PARA LOS USOS PREVISTOS DEL COMPRADOR.

8 **Garantía del producto**. Todas las garantías son personales en relación con el comprador y no se pueden transferir ni asignar a un tercero, incluido un afiliado del comprador. Todas las garantías son específicas de las instalaciones y no se transfieren si el producto se traslada a otra instalación del comprador, a menos que Illumina efectúe dicho traslado.

a **Garantía de los consumibles**. Illumina garantiza que los consumibles, que no sean consumibles personalizados, cumplirán sus especificaciones hasta un período de (i) 3 meses a partir de la fecha de envío por parte de Illumina, y (ii) cualquier fecha de caducidad o el final de su vida útil impresa previamente en dicho consumible por parte de Illumina, pero en ningún caso será superior a un período de 12 meses a partir de la fecha de envío. En relación con los consumibles personalizados (esto es, consumibles fabricados de acuerdo con las especificaciones o los diseños elaborados por el comprador o que el comprador, o alguna entidad en su nombre, proporciona a Illumina), Illumina solo garantiza que los consumibles personalizados se fabricarán y probarán de acuerdo con los procesos de control de calidad y fabricación estándar de Illumina. Illumina no garantiza que los consumibles personalizados funcionen de manera prevista por el comprador o para los usos previstos del comprador.

b **Garantía del hardware**. Illumina garantiza que el hardware, siempre que no se trate de componentes actualizados, cumplirá sus especificaciones durante un período de 12 meses tras la fecha de envío por parte de Illumina, a menos que el hardware incluya la instalación ofrecida por Illumina, en cuyo caso el período de garantía comienza en la fecha de instalación o 30 días después de la fecha de envío, lo que ocurra primero ("Garantía básica del hardware"). El término "componentes actualizados" hace referencia a los componentes, las modificaciones o las mejoras de Illumina en el hardware que el comprador haya adquirido previamente. Illumina garantiza que los componentes actualizados cumplirán sus especificaciones durante un período de 90 días a partir de la fecha de instalación de dichos componentes actualizados. Los componentes actualizados no amplían el período de garantía del hardware a menos que la actualización la haya llevado a cabo Illumina en las instalaciones de Illumina, en cuyo caso el hardware actualizado enviado al comprador incorporará una garantía básica del hardware.

c **Exclusiones de la cobertura de la garantía**. Las anteriores garantías no se aplican en la medida en que un incumplimiento se deba a (i) un abuso, uso indebido, abandono, negligencia, accidente, almacenamiento inadecuado o un uso contrario a las disposiciones de la documentación o las especificaciones, (ii) una manipulación, instalación, mantenimiento o reparación indebidas (que no sean realizadas por el personal de Illumina), (iii) alteraciones no autorizadas, (iv) sucesos de fuerza mayor, o bien (v) su uso con un producto de terceros no suministrado por Illumina (a menos que la documentación o las especificaciones del producto dispongan de manera expresa que dicho producto de tercero es para su uso con el producto).

d **Procedimiento para la cobertura de la garantía**. Con el objeto de ser apto para cualquier servicio de reparación o sustitución conforme a esta garantía, el comprador debe (i) ponerse en contacto con la mayor brevedad posible con el departamento de asistencia de Illumina para informarle del incumplimiento, (ii) cooperar con Illumina en la confirmación o el diagnóstico del incumplimiento y (iii) devolver este producto, con pago previo de los costes de transporte a Illumina de acuerdo con las instrucciones de Illumina o, si se acuerda entre Illumina y el comprador, conceder acceso a este producto al personal de reparación autorizado de Illumina con el objeto de confirmar el incumplimiento y realizar las reparaciones pertinentes.

e **Único recurso legal conforme a la garantía**. Según su criterio, Illumina reparará o sustituirá el producto no conforme a las especificaciones que se confirme que está cubierto por esta garantía. Los consumibles reparados o sustituidos ofrecen una garantía de 30 días. El hardware se puede reparar o sustituir por un hardware o componentes funcionalmente equivalentes, reacondicionados o nuevos (solo si un componente del hardware no cumple las especificaciones). Si el hardware se sustituye en su totalidad, el período de garantía correspondiente a la sustitución es de 90 días a partir de la fecha de envío o el período restante de la garantía del hardware original, lo que sea más breve. Si solo se repara o sustituye un componente, el período de garantía de dicho componente será de 90 días a partir de la fecha de envío o el período restante de la garantía del hardware original, lo que finalice antes. Las

anteriores disposiciones establecen la única solución del comprador y las únicas obligaciones de Illumina conforme a la garantía que se otorga por la presente.

f **Productos de terceros y garantía**. Illumina no tiene ninguna obligación de garantía en relación con ningún producto procedente de un tercero y que se suministre al comprador de acuerdo con los presentes términos y condiciones. Los productos de terceros son aquellos que están etiquetados o se comercializan con el nombre de un tercero. La garantía de los productos de terceros, si la hubiera, la proporciona el fabricante original. Mediante una solicitud por escrito, Illumina intentará transferir dicha garantía al comprador.

9 **Indemnización**.

a **Indemnización por infracción por parte de Illumina**. Conforme a estos términos y condiciones, incluidas entre otras, las exclusiones de las obligaciones de indemnización de Illumina (sección 9[b] más adelante) y las condiciones de obligación de indemnización (sección 9[d] a continuación), Illumina (i) defenderá, indemnizará y eximirá al comprador frente a cualquier reclamación o demanda de terceros en la que se alegue que este producto, al utilizarse con fines de investigación, de acuerdo con estos términos y condiciones y de acuerdo con la documentación y las especificaciones de este producto, infringe los derechos de propiedad intelectual válidos y ejecutables de un tercero, y (ii) pagará todas las liquidaciones derivadas, y todos los costes y juicios finales (incluidos los honorarios razonables de los abogados) que se le imputen al comprador en relación con dicha reclamación de infracción. Si este producto, o alguna de sus partes, pasa a ser, o según la opinión de Illumina puede ser, el objeto de una reclamación por infracción, Illumina tendrá derecho, según su propio criterio, a (A) procurar al comprador el derecho a continuar utilizando este producto, (B) modificar o sustituir este producto con una sustitución no infractora sustancialmente equivalente, o bien (C) solicitar la devolución de este producto y finalizar los derechos, la licencia y cualquier otro permiso otorgado al comprador en relación con este producto, así como a reembolsar al comprador el valor depreciado (tal como se muestra en los registros oficiales del comprador) del producto devuelto en el momento de dicha devolución, siempre que no se otorgue ningún tipo de reembolso para consumibles utilizados o caducados. Esta sección establece la responsabilidad total de Illumina por cualquier infracción de derechos de propiedad intelectual de terceros.

b **Exclusiones de obligaciones de indemnización por parte de Illumina**. Illumina no tiene la obligación de defender, indemnizar ni eximir al comprador frente a ninguna reclamación por infracción de Illumina en la medida en que dicha infracción se deba a los siguientes casos: (i) el uso de este producto en una manera o para un propósito que se encuentre fuera del ámbito de la finalidad de uso para investigación, (ii) el uso de este producto en una manera que no sea conforme a sus especificaciones, su documentación, los derechos concedidos de manera expresa al comprador conforme estos términos y condiciones, o cualquier infracción por parte del comprador de estos términos y condiciones, (iii) el uso de este producto junto con cualquier otro producto, material o servicio no prestados por Illumina, (iv) el uso de este producto para realizar un ensayo u otro proceso no proporcionado por Illumina, o bien (v) el cumplimiento de las especificaciones o instrucciones por parte de Illumina para este producto que ha proporcionado el comprador, o que se han proporcionado en su nombre (las condiciones de [i] a [v] se denominan "reclamación excluida").

c **Indemnización por parte del comprador**. El comprador defenderá, indemnizará y mantendrá indemnes a Illumina, sus afiliados, sus colaboradores no afiliados y los socios de desarrollo que contribuyeron al desarrollo de este producto, así como a sus directivos, directores, representantes y empleados correspondientes frente a cualquier reclamación, responsabilidad, daño, multa, pena, demanda y pérdida de cualquier tipo, incluidas, a modo enunciativo pero no taxativo, las reclamaciones por daños personales o muerte y la infracción de los derechos de propiedad intelectual de terceros, que se deriven, estén relacionados o procedan de (i) una infracción por parte del comprador de cualquiera de estos términos y condiciones, (ii) el uso del comprador de este producto fuera del ámbito de su uso para investigación, (iii) cualquier uso de este producto que no sea conforme a las especificaciones o la documentación de este documento, o bien (iv) cualquier reclamación excluida.

d **Condiciones para obligaciones de indemnización**. Las obligaciones de indemnización de las partes estarán condicionadas por las siguientes acciones de la parte que solicita la indemnización: (i) notificación inmediata a la otra parte por escrito de dicha reclamación o demanda, (ii) concesión de autorización y control exclusivo a la otra parte

sobre la defensa y arreglo de cualquier reclamación o demanda, (iii) no admisión de la infracción de ningún derecho de propiedad intelectual sin el consentimiento previo por escrito de la otra parte, (iv) la no negociación de ningún acuerdo o compromiso en relación con dicha reclamación o demanda sin el consentimiento previo por escrito de la otra parte y (v) la prestación de asistencia razonable a la otra parte en la defensa de la reclamación o demanda, siempre que la parte reembolse a la parte indemnizada los gastos razonables complementarios que se deriven de la prestación de dicha asistencia.

e **Productos de terceros e indemnización**. Illumina no tiene ninguna obligación de indemnización en relación con ningún producto procedente de un tercero y que se suministre al comprador. Los productos de terceros son aquellos que están etiquetados o se comercializan con el nombre de un tercero. Los derechos de indemnización del comprador, si los hubiera, en relación con los productos de terceros serán conforme a la indemnización del propietario de la patente o del fabricante original. Mediante una solicitud por escrito, Illumina intentará transferir dicha indemnización, si la hubiera, al comprador.

Historial de revisiones

N.º de referencia	Rev.	Fecha	Descripción del cambio
15035786_ESP	D	Noviembre de 2014	Actualización del flujo de trabajo del modo de experimento rápido para incluir la compatibilidad con el análisis químico de HiSeq Rapid v2. Sustitución de lavado de mantenimiento con NaOH por el lavado de mantenimiento con Tween 20 y ProClin 300 incluida la información sobre la preparación, el almacenamiento y el desecho de la solución de lavado de mantenimiento. Actualización de las descripciones del lavado de mantenimiento y del lavado con agua para especificar que se debe realizar un lavado con agua tras cada experimento. Adición de descripciones sobre el flujo de trabajo, los archivos de entrada y salida, la solución de errores y la puntuación de calidad en el capítulo Análisis en tiempo real. Actualización del número de catálogo de VWR para las toallitas con alcohol a 95041-714. Actualización de la URL de las hojas de datos de seguridad (SDS) a support.illumina.com/sds.html.
15035786_ESP	C	Abril de 2014	Actualización de descripciones del software de control de HiSeq v2.2, que incluye el modo de rendimiento elevado de HiSeq v4, la eliminación de la opción de carril de control, la agrupación de puntuaciones Q predeterminada y la opción de utilización de diferentes esquemas de indexación en cada carril. Adición del flujo de trabajo de HiSeq v4 para su utilización con química de HiSeq v4. Adición del cálculo del volumen de cebado de SBS total.

N.º de referencia	Rev.	Fecha	Descripción del cambio
15035786_ESP	B	Noviembre de 2013	Eliminación de las instrucciones de preparación de reactivos. Para obtener las instrucciones de preparación de reactivos, incluida la información acerca de los diversos cebadores de secuenciación, consulte la documentación del kit correspondiente. Sustitución de los siguientes reactivos: • RMR para RMX
15035786_ESP	A	Octubre de 2012	Publicación inicial.

Índice

Historial de revisiones ix
Índice xi

Capítulo 1 Descripción general 1

Introducción 2
Componentes de HiSeq 2500 3
Inicio de HiSeq 2500 7
Software de HiSeq 2500 9
Espacio disponible en el disco 15
Descripción de hoja de muestras 16
Consumibles para secuenciación 17
Recursos adicionales 19

Capítulo 2 Realización de un experimento de HiSeq v4 21

Introducción 22
Flujo de trabajo de secuenciación de HiSeq v4 23
Tipos de experimentos para química de HiSeq v4 24
Introducción de parámetros del experimento 25
Carga y cebado de reactivos 30
Carga de una celda de flujo 41
Monitorización del experimento 47

Capítulo 3 Realización de un experimento de TruSeq v3 49

Introducción 50
Flujo de trabajo de la secuenciación de TruSeq v3 52
Tipos de experimentos para química de TruSeq v3 54
Introducción de parámetros del experimento 55
Carga y cebado de reactivos 61
Carga de una celda de flujo 71
Monitorización del experimento 77
Preparación de reactivos para la Lectura 2 79
Carga de reactivos para la Lectura 2 80

Capítulo 4 Realización de un experimento rápido 83

Introducción 84
Flujo de trabajo de la secuenciación de experimento rápido 86
Tipos de experimento para química de experimento rápido 87
Comprobación del volumen previa al experimento 89
Introducción de parámetros del experimento 90
Carga y cebado de reactivos 96
Carga de una celda de flujo 106
Monitorización del experimento 112

Capítulo 5 Procedimientos posteriores al experimento 115

Introducción 116
Descarga y cálculo del peso de los reactivos 117
Realización de un lavado de mantenimiento 118
Realización de un lavado con agua 122
Cambio de modos de secuenciación 124
Inactividad del instrumento 126
Apagado del instrumento 127

Capítulo 6 Análisis en tiempo real 129

Introducción 130
Descripción de análisis en tiempo real 131
Supervisión de criterios de medición de experimento 134
Flujo de trabajo del análisis en tiempo real 136
Archivos de salida de secuenciación 141
Estructura de carpetas de salida 143
Numeración de placas 145
Imágenes en miniatura 146

Capítulo 7 Solución de problemas 147

Introducción 148
Posibles problemas de configuración de experimentos 149
Escalonamiento de experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B 151
Realización de una comprobación de fluídica 152
BaseSpace no está disponible 153
Detención y reanudación de un experimento 154
Pausa de un experimento 158
Rehibridación del cebador 160

Índice alfabético 163

Asistencia técnica 167

Capítulo 1

Descripción general

Introducción 2
Componentes de HiSeq 2500 3
Inicio de HiSeq 2500 7
Software de HiSeq 2500 9
Espacio disponible en el disco 15
Descripción de hoja de muestras 16
Consumibles para secuenciación 17
Recursos adicionales 19

Introducción

El sistema HiSeq® combina la tecnología más avanzada con tecnología SBS probada para establecer nuevos estándares de resultados, sencillez y rentabilidad.

HiSeq 2500 incluye las siguientes características:

- **Adquisición de imágenes de las dos superficies:** HiSeq 2500 utiliza un sistema de epifluorescencia de cuatro cámaras con una tecnología de adquisición de imágenes innovadora que permite la adquisición de imágenes de las dos superficies.
- **Dobles celdas de flujo:** HiSeq 2500 es un sistema de doble celda de flujo, que permite la secuenciación simultánea de una celda de flujo o de dos celdas de flujo con diferentes longitudes de lectura.
- **Generación de grupos integrada en el instrumento:** HiSeq 2500 ofrece la opción de un modo de experimento rápido que incluye la generación de grupos integrada en el instrumento.
- **Refrigerador de reactivos de alta capacidad:** El compartimento de reactivos es un refrigerador de alta capacidad que alberga la cantidad de reactivos suficiente para todo el experimento de secuenciación.
- **Fluídica integrada para experimentos "paired-end":** La fluídica integrada para experimentos "paired-end" suministra reactivos del compartimento de reactivos a la celda de flujo para la resíntesis de la Lectura 2 y para la secuenciación indexada.
- **Opciones de control de la interfaz:** La interfaz del software del instrumento proporciona opciones para la configuración de un experimento y la utilización del instrumento con el monitor táctil o el teclado integrado.
- **Llamada de bases en tiempo real:** El software del instrumento extrae las intensidades de las imágenes y realiza la llamada de bases clasificada por calidad en el ordenador del instrumento, lo que permite la supervisión de los criterios de medición de calidad y ahorra tiempo en los posteriores análisis de datos.

  Los análisis sucesivos de datos de secuenciación se pueden realizar con el software de análisis de Illumina u otros proveedores en IlluminaCompute, en BaseSpace de Illumina o en una infraestructura personalizada.
- **Conectividad de BaseSpace:** HiSeq 2500 incluye una opción para enviar datos de estado y secuenciación del instrumento a la solución genómica en la nube BaseSpace en tiempo real para simplificar el control de calidad y el análisis del instrumento.

Componentes de HiSeq 2500

El sistema HiSeq 2500 incluye el instrumento, el monitor, el ordenador de control del instrumento y los accesorios, como el teclado, el ratón y el lector de códigos de barras. El instrumento incluye cuatro compartimentos principales: el módulo óptico, el compartimento de la celda de flujo, el compartimento de fluídica y el compartimento de reactivos. El estado de funcionamiento del instrumento se indica en una barra de estado luminosa.

Figura 1 Componentes externos

A **Módulo óptico:** Contiene componentes ópticos que permiten la adquisición de imágenes de las dos superficies de la celda de flujo, digitalizando A, C, G y T al mismo tiempo mediante epifluorescencia. El haz láser de excitación pasa a través del objetivo, que capta también la fluorescencia.

B **Compartimento de la celda de flujo y estación de carga de bibliotecas:** Contiene la platina de la celda de flujo controlada por vacío, que mantiene las celdas de flujo en su sitio durante experimentos de secuenciación. Mediante el uso del modo de experimento rápido, la estación de carga transfiere bibliotecas a la celda de flujo para la generación de grupos integrada en el instrumento.

C **Compartimento de fluídica:** Contiene bombas de fluídica que suministran reactivos a la celda de flujo y, a continuación, al contenedor de residuos.

D **Barra de estado:** Utiliza tres colores para indicar el estado del instrumento. El azul indica que el instrumento está en funcionamiento, el naranja indica que el instrumento necesita

atención y el verde indica que el instrumento está listo para empezar el siguiente experimento.

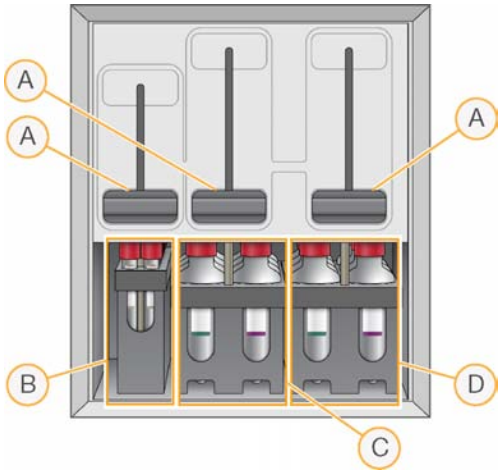
E **Compartimento de reactivos:** Contiene gradillas de reactivos que contienen a su vez los reactivos necesarios para los experimentos de secuenciación y soluciones de lavado para el lavado del instrumento.

Compartimento de reactivos

El compartimento de reactivos es un refrigerador de reactivos de alta capacidad que contiene tres gradillas de reactivos: dos para reactivos SBS y una para reactivos de agrupación, indexación y "paired-end". Los mangos de los dispensadores bajan los dispensadores y los introducen en las botellas de reactivo.

- **Gradillas de reactivos SBS:** Albergan botellas cónicas de 250 ml. La gradilla de reactivos de la celda de flujo A se encuentra en la posición central y la gradilla de la celda de flujo B se encuentra en la posición más a la derecha. Cada gradilla de reactivos tiene posiciones numeradas que se corresponden con las conexiones en una válvula selectora de reactivos interna.
- **Gradilla de reactivos de agrupación, indexación y "paired-end":** La gradilla de reactivos, situada a la izquierda de las gradillas A y B, tiene dos filas de posiciones numeradas que albergan tubos cónicos de 15 ml que contienen los reactivos "paired-end", de agrupación y de indexación. La fila izquierda es para la celda de flujo A, mientras que la fila derecha es para la celda de flujo B.
- **Refrigerador de reactivos:** El refrigerador de reactivos aloja las gradillas de reactivos y mantiene una temperatura interna de entre 2 °C y 8 °C.

Figura 2 Compartimento de reactivos

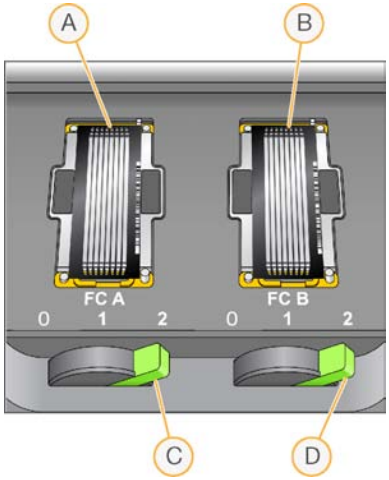


A Mangos del dispensador
B Gradilla de reactivos para reactivos de agrupación, indexación y "paired-end"
C Gradilla de reactivos para reactivos SBS de la celda de flujo A
D Gradilla de reactivos para reactivos SBS de la celda de flujo B

Compartimento de la celda de flujo

El compartimento de la celda de flujo contiene la platina de la celda de flujo, las estaciones térmicas, el sistema de vacío y las conexiones del sistema de fluídica para la celda de flujo.

Figura 3 Platina de la celda de flujo con dos celdas de flujo



A Celda de flujo A
B Celda de flujo B
C Palanca de la celda de flujo A
D Palanca de la celda de flujo B

La celda de flujo a la izquierda es la celda de flujo A y la celda de flujo a la derecha es la celda de flujo B.

Cada celda de flujo se encuentra en la platina de la celda de flujo, que entra y sale del módulo óptico según indique el software de control. La platina de la celda de flujo debe encontrarse en la posición más avanzada para abrir la puerta del compartimento de la celda de flujo y cargar o extraer una celda de flujo.

La celda de flujo está colocada en el soporte de la celda de flujo con los orificios de entrada y salida mirando hacia abajo, y fijada en su sitio mediante vacío bajo cada soporte de celda de flujo. La palanca de la celda de flujo iluminada delante de cada soporte de la celda de flujo controla el vacío. La palanca de la celda de flujo cambia a verde cuando la junta de vacío está asegurada.

Inicio de HiSeq 2500

1. Inicie el ordenador de control del instrumento.
2. Inicie sesión en el sistema operativo con el nombre de usuario y la contraseña predeterminados.
   - Nombre de usuario: sbsuser
   - Contraseña: sbs123

   Espere hasta que se haya cargado por completo. Si los valores predeterminados no funcionan, pida al administrador de las instalaciones el nombre de usuario y la contraseña específicos de su centro.
3. Coloque el interruptor de alimentación principal en la posición ON (Encendido). Al mirar la parte delantera del instrumento, el interruptor de alimentación está situado en el lado izquierdo.
4. Espere al menos un minuto a que los dispositivos del instrumento se hayan configurado correctamente y a que se inicialice la unidad del instrumento llamada DoNotEject. Se abre una ventana cuando se inicia la unidad. Cierre la ventana. Si la ventana no se abre, utilice MyComputer para comprobar la unidad DoNotEject.

   NOTA
   No extraiga nunca la unidad flash DoNotEject ubicada dentro del chasis del instrumento ni modifique los archivos dentro de dicha unidad. Esta unidad contiene archivos de configuración del hardware y se inicia cada vez que el instrumento está encendido.
5. Para asegurarse de que queda espacio suficiente en el disco, archive en una ubicación de red los datos de experimentos anteriores guardados en el ordenador.
6. Abra el Software de control de HiSeq (HCS) con el icono de acceso directo situado en el escritorio del ordenador. El software de control tarda unos minutos en inicializarse. Cuando se inicializa el software, se abre la pantalla Mode Select (Selección de modo) y aparece el icono de inicialización

en la esquina inferior derecha de la pantalla.

Prácticas recomendadas del instrumento y el ordenador de control

- No encienda el ordenador mientras el instrumento está en funcionamiento. Encienda siempre el ordenador antes de encender el instrumento.
- No apague nunca el instrumento mientras se esté ejecutando el software de control del instrumento.

- Espere un minuto tras apagar el instrumento y antes de volver a encenderlo.
- Conecte los cables USB del instrumento, el monitor y el teclado en la parte posterior del ordenador antes de encender el ordenador.
- Conecte el lector de códigos de barras y el ratón en los puertos USB de la parte delantera del ordenador.

Software de HiSeq 2500

Hay tres aplicaciones de software instaladas en el ordenador del instrumento:

- **Software de control de HiSeq 2500:** La interfaz de Software de control de HiSeq (HCS) le guía por los pasos de configuración de un experimento de secuenciación. Durante el experimento, el software de control opera el hardware del instrumento, controla la fluídica, establece las temperaturas y proporciona un resumen visual de las estadísticas de calidad.
- **Software de análisis en tiempo real:** Integrado con el software de control, el análisis en tiempo real (RTA) realiza la llamada de bases y asigna una puntuación de calidad a cada base de cada ciclo. Para obtener más información, consulte *Análisis en tiempo real* en la página 129.
- **Software del visor del análisis de secuenciación:** El visor del análisis de secuenciación (SAV) proporciona estadísticas de calidad detalladas.

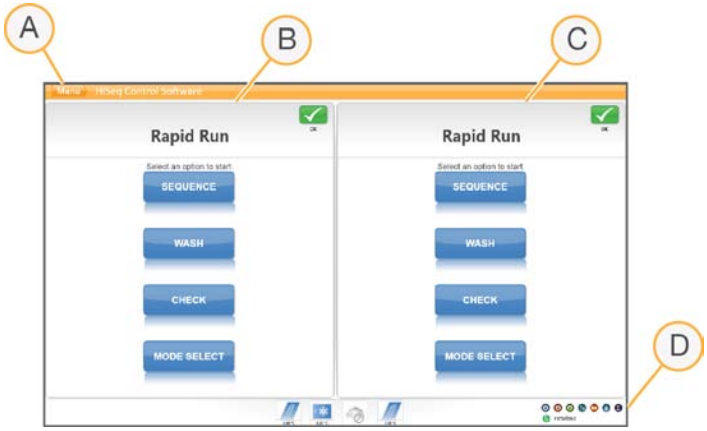
Interfaz del software de control de HiSeq 2500

La pantalla Mode Select (Selección de modo) incluye opciones de modos de experimentos. Los modos incluyen TruSeq v3, HiSeq v4 y el modo de experimento rápido. Seleccione un modo de experimento para continuar con la pantalla Welcome (Bienvenida). Dado que solo pueden realizarse de manera simultánea experimentos del mismo modo, el modo seleccionado se aplica a las celdas de flujo A y B.

La pantalla Welcome (Bienvenida) se divide en dos paneles, uno para cada celda de flujo. Puede configurar un experimento para la celda de flujo A y la celda de flujo B en paralelo con ayuda de la interfaz del software. Los experimentos también se pueden configurar de manera independiente con la interfaz del software.

La pantalla Welcome (Bienvenida) ofrece comandos para iniciar un experimento de secuenciación, lavar el instrumento, ejecutar una comprobación del sistema y modificar los modos. El modo actual aparece en la parte superior de la pantalla. Cuando el experimento haya finalizado, el software le solicita lavar el instrumento. Tras el lavado, el software vuelve a la pantalla Welcome (Bienvenida).

Figura 4 Pantalla de bienvenida



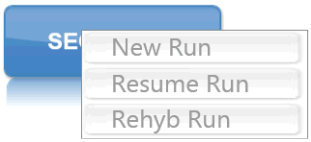
A Botón del menú de la pantalla de bienvenida
B Panel de la interfaz para la celda de flujo A
C Panel de la interfaz para la celda de flujo B
D Indicadores de actividad

Comandos de la pantalla de bienvenida

Los comandos de la pantalla Welcome (Bienvenida) incluyen Sequence (Secuenciar), Wash (Lavado), Check (Comprobar) y Mode Select (Selección de modo).

- **Sequence** (Secuenciar): Seleccione **Sequence** (Secuenciar) para comenzar los pasos de configuración de un nuevo experimento de secuenciación o reanudar un experimento existente.

Figura 5 Opciones del comando Sequence (Secuenciar)

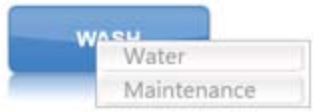


- **New Run** (Nuevo experimento): El software le guiará por los pasos de especificación de los parámetros del experimento, la carga y el cebado de los reactivos, la carga de la celda de flujo, la comprobación de la fluídica y el inicio del experimento.

- **Resume Run** (Reanudar experimento): El software le guía por los pasos de selección de la carpeta del experimento existente y de los parámetros de configuración para la reanudación del experimento.
- **Rehyb Run** (Experimento de rehibridación): El software le guía a través de los pasos para realizar una rehibridación de cebadores integrada en el instrumento. Esta función solo está disponible en HiSeq v4 y en el modo de experimento rápido.

- **Wash** (Lavado): Seleccione **Wash** (Lavado) para iniciar un lavado con agua o de mantenimiento en el instrumento.

Figura 6 Opciones del comando Wash (Lavado)



- **Water Wash** (Lavado con agua): El lavado con agua inyecta agua en el sistema. Este lavado debe realizarse tras un experimento de secuenciación o después de que el instrumento haya estado inactivo durante 1 día o más. Consulte *Realización de un lavado con agua* en la página 122.
- **Maintenance Wash** (Lavado de mantenimiento): El lavado de mantenimiento inyecta Tween 20 y ProClin 300 en el sistema. Este lavado se debe realizar antes de cambiar de modo o cada diez días y se recomienda tras un experimento de rendimiento elevado. Consulte *Realización de un lavado de mantenimiento* en la página 118.

- **Check** (Comprobar): Seleccione **Check** (Comprobar) para abrir la pantalla de comprobación de la fluídica y confirmar un flujo adecuado durante la instalación del instrumento o la solución de problemas relacionados con la fluídica.
- **Mode Select** (Selección de modo): Seleccione **Mode Select** (Selección de modo) para cambiar los modos de experimento. Los modos de experimento incluyen TruSeq v3, HiSeq v4 y el modo de experimento rápido.

Indicadores de actividad y del sensor

La pantalla de bienvenida contiene una serie de iconos en la esquina inferior derecha de la pantalla que indican la actividad del instrumento y el estado de sus componentes específicos en función de sensores del instrumento.

Figura 7 Indicadores de actividad

De izquierda a derecha, los indicadores de actividad representan los motores X, Y y Z, la funcionalidad de los componentes electrónicos, la cámara, el sistema de fluídica y las funciones de procesamiento.

Figura 8 Indicadores del sensor

De izquierda a derecha, los indicadores del sensor representan la temperatura de la celda de flujo A, la temperatura del refrigerador de reactivos, el estado de BaseSpace en la nube y la temperatura de la celda de flujo B.

Iconos de estado

Los iconos de estado se encuentran ubicados en la esquina superior derecha de cada pantalla y le notifican cualquier cambio en las condiciones, errores o advertencias durante la configuración de un experimento o durante el experimento.

Icono de estado	Nombre de estado	Descripción
	Estado OK	Sin cambios. El sistema está normal.
	Información	Solo información. No se requiere ninguna acción.
	Atención	Información que puede requerir atención.
	Advertencia	Las advertencias no detienen un experimento, pero pueden requerir una acción antes de continuar.
	Error	Los errores suelen detener un experimento y normalmente requieren una acción antes de continuar con el experimento.

Cuando se produce un cambio en las condiciones, el icono asociado parpadea para alertarle. Para resolver la alerta, seleccione el icono para abrir el cuadro de diálogo de estado, que contiene una descripción general del estado. Seleccione **Acknowledge** (Aceptar) para aceptar el mensaje y **Close** (Cerrar) para cerrar el cuadro de diálogo.

Menú de pantalla de bienvenida

El botón del menú de la pantalla Welcome (Bienvenida), ubicado en la esquina superior izquierda de esta pantalla, proporciona las siguientes opciones:

- **View** (Ver): Proporciona las opciones para ver la interfaz en pantalla completa o en una ventana, o permite minimizar la interfaz.
- **Tools** (Herramientas): Proporciona acceso a la ventana Options (Opciones) y Show Log file (Mostrar archivo de registro):
  - **Options** (Opciones): En la ventana Options (Opciones), defina los parámetros predeterminados del experimento. Consulte *Ventana del menú de opciones* en la página 13.
  - **Show Log File** (Mostrar archivo de registro): Enumera los errores que se han producido en el software de control. El archivo está vacío a menos que se produzca un error. Utilice este archivo de registro para solucionar posibles problemas.
- **Scanner** (Lector): Activa el comando para inicializar manualmente el software.
- **About** (Acerca de): Proporciona información sobre el hardware del instrumento, las versiones del software y la información de contacto del servicio de asistencia técnica.
- **Exit** (Salir): Cierra la interfaz del software de control.

Ventana del menú de opciones

La ventana del menú de opciones permite configurar parámetros para definir el modelo de ID del experimento, las ubicaciones de carpeta predeterminadas, un servidor LIMS, el nombre de usuario y la contraseña, así como la posibilidad de enviar información de estado del instrumento a Illumina.

Figura 9 Ventana del menú de opciones

- **Run ID Template** (Modelo de ID del experimento): La convención de nomenclatura utilizada para generar los nombres de las carpetas del experimento.
- **Default Output Folder** (Carpeta de salida predeterminada): La carpeta de salida predeterminada para los experimentos de la celda de flujo A. Esta ubicación se puede cambiar para cada experimento.
- **Default Output Folder2** (Carpeta de salida predeterminada 2): La carpeta de salida predeterminada para los experimentos de la celda de flujo B. Esta opción se puede cambiar para cada experimento.
- **Default Temp Folder1** (Carpeta temporal predeterminada 1): La ubicación en la que se pueden escribir los archivos temporales durante un experimento.
- **Run Setup Folder** (Carpeta de configuración del experimento): La ubicación de los formularios de muestra de LIMS.
- **LIMS Server** (Servidor LIMS): El nombre del servidor para interacciones con LIMS de Illumina compatibles.
- **LIMS User Name** (Nombre de usuario de LIMS): El nombre de usuario utilizado para la autenticación a LIMS de Illumina.
- **LIMS Password** (Contraseña de LIMS): La contraseña utilizada para la autenticación a LIMS de Illumina.
- **Send instrument health information to Illumina to aid technical support** (Enviar la información de estado del sistema a Illumina para ayudar al servicio de asistencia técnica): Permite al instrumento enviar información a BaseSpace para cada experimento. Toda la información será confidencial. Illumina recomienda activar esta función.

Espacio disponible en el disco

El ordenador del instrumento HiSeq cuenta con una capacidad de almacenamiento superior a 2,7 TB por cada celda de flujo. Los datos de la celda de flujo A se almacenan en la unidad D:, mientras que los datos de la celda de flujo B se almacenan en la unidad E:.

Al final de cada ciclo de adquisición de imágenes de cada carril, el software comprueba el espacio disponible en disco de las unidades D: y E: locales. El software no comprueba la ubicación de la red durante el experimento. Si el espacio en disco es inferior al umbral de seguridad, el software pone en pausa el experimento y coloca la celda de flujo en un estado seguro.

Si hay poco espacio en el disco, auméntelo para continuar el experimento. Cuando haya suficiente espacio en el disco, se reanudará automáticamente el experimento.

Descripción de hoja de muestras

La hoja de muestras es un archivo generado por el usuario en formato *.csv que almacena información sobre el experimento de secuenciación. Cuando comienza el experimento, el software copia la hoja de muestras en la carpeta del experimento que posteriormente se utiliza para su análisis.

Las hojas de muestras son opcionales salvo si utiliza BaseSpace para realizar análisis de datos, ejecutar un experimento de indexación o prevé supervisar el rendimiento de la demultiplexación con el visor del análisis de secuenciación. Utilice Illumina Experiment Manager (IEM) para crear una hoja de muestras ***antes*** de comenzar el experimento.

Consumibles para secuenciación

La secuenciación en el HiSeq 2500 requiere los reactivos y demás consumibles incluidos en los kits de Illumina. Los kits necesarios varían en función del tipo de experimento que vaya a realizar.

- Para los experimentos de rendimiento elevado de HiSeq v4, consulte *Consumibles para secuenciación de HiSeq v4* en la página 22.
- Para los experimentos de rendimiento elevado de TruSeq v3, consulte *Consumibles para secuenciación de TruSeq v3* en la página 50.
- Para los experimentos rápidos, consulte *Consumibles para secuenciación del experimento rápido* en la página 84.

Consumibles proporcionados por el usuario

Consumible	Proveedor	Finalidad
Tween 20, líquido viscoso, 100 ml	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949	Lavado de mantenimiento del instrumento.
ProClin 300, 50 ml	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 48912-U	Lavado de mantenimiento del instrumento.
Paño humedecido en alcohol isopropílico al 70 % o Etanol al 70 %	VWR, n.º de catálogo 95041-714 Proveedor de laboratorio general	Limpieza de la celda de flujo y de la platina de la celda de flujo.
Tubos de centrifugado, 250 ml	Corning, n.º de catálogo 430776	Lavado de mantenimiento y con agua del instrumento.
Tubos cónicos, 15 ml	Corning, n.º de catálogo 430052	Recogida y medición de volúmenes de residuos. Lavado de mantenimiento y con agua del instrumento.
Tubos cónicos, 50 ml, autónomos (opcional)	Corning, n.º de catálogo 430921	Almacenamiento de celdas de flujo.
Bidón, 6 litros mínimo	Proveedor de laboratorio general	Solución de lavado de mantenimiento.
Guantes desechables sin polvo	Proveedor de laboratorio general	Uso general.
Toallitas para laboratorio sin pelusa	VWR, n.º de catálogo 21905-026	Limpieza del soporte de la celda de flujo.

Consumible	Proveedor	Finalidad
Papel para lentes, 4 × 6 pulg.	VWR, n.º de catálogo 52846-001	Limpieza de la celda de flujo.
Puntas de pipeta, 200 µl	Proveedor de laboratorio general	División de los volúmenes del kit de reactivos.
Puntas de pipeta, 1000 µl	Proveedor de laboratorio general	División de los volúmenes del kit de reactivos.
Pinzas de plástico con punta cuadrada	McMaster-Carr, n.º de catálogo 7003A22	Eliminación de las juntas de celda de flujo.
Agua de laboratorio, 18 MOhm	Millipore	Gradilla de reactivos SBS, posición 2. Lavado del instrumento.

Tubos de microcentrífuga para el modo de experimento rápido

Consumible	Proveedor
Tubo de microcentrífuga, 1,5 ml	VWR, n.º de catálogo 20170-038, n.º de catálogo 20170-650 o n.º de catálogo 89000-028 Axygen, n.º de catálogo MCT-150-C
Tubo de microcentrífuga, 1,7 ml	VWR, n.º de catálogo 20170-575 Axygen, n.º de catálogo MCT-175-C Sorenson BioScience, n.º de catálogo 16070

Recursos adicionales

Puede descargar la siguiente documentación en el sitio web de Illumina.

Recurso	Descripción
Guía de preparación del centro de HiSeq 2500, 1500 y 2000 (n.º de referencia 15006407_ESP)	Proporciona especificaciones para el espacio del laboratorio, los requisitos eléctricos y las cuestiones medioambientales.
Guía de cumplimiento y seguridad de HiSeq (n.º de referencia 15012614)	Proporciona información sobre el etiquetado del instrumento, las certificaciones de conformidad y las cuestiones de seguridad.
HiSeq Cluster Kit v4 Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de HiSeq Cluster Kit v4), n.º de referencia 15050104	Proporciona una descripción del contenido del kit de generación de grupos e instrucciones para preparar los consumibles antes de un experimento de secuenciación.
HiSeq Rapid Cluster Kit v2 Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de HiSeq Rapid Cluster Kit v2), n.º de referencia 15059131	Proporciona una descripción del contenido del kit de grupos rápido e instrucciones para preparar los consumibles antes de un experimento de secuenciación rápido.
HiSeq SBS Kit v4 Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de HiSeq SBS Kit v4), n.º de referencia 15050108	Proporciona una descripción del contenido del kit de SBS e instrucciones para preparar los consumibles antes de un experimento de secuenciación.
HiSeq Rapid SBS Kit v2 Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de HiSeq Rapid SBS Kit v2), n.º de referencia 15058772	Proporciona una descripción del contenido del kit de SBS rápido e instrucciones para preparar los consumibles antes de un experimento de secuenciación rápido.
Desnaturalización y dilución de bibliotecas para HiSeq y GAIIx (n.º de referencia 15050107)	Proporciona instrucciones para la desnaturalización y dilución de bibliotecas preparadas para un experimento de secuenciación, y la preparación de un control PhiX. Este paso se aplica a la mayoría de los tipos de bibliotecas.

Visite la página de asistencia de HiSeq 2500 en el sitio web de Illumina para acceder a la documentación, las descargas de software, la formación en línea y las preguntas frecuentes.

Capítulo 2

Realización de un experimento de HiSeq v4

Introducción 22
Flujo de trabajo de secuenciación de HiSeq v4 23
Tipos de experimentos para química de HiSeq v4 24
Introducción de parámetros del experimento 25
Carga y cebado de reactivos 30
Carga de una celda de flujo 41
Monitorización del experimento 47

Introducción

Para realizar un experimento de HiSeq v4 en el HiSeq 2500, prepare todos los reactivos del experimento y, a continuación, el software le solicitará que configure el experimento. Los pasos para la configuración del experimento incluyen la introducción de los parámetros del experimento, la carga y el cebado de reactivos, la carga de la celda de flujo y la realización de una comprobación de fluídica.

Visite la página de especificaciones de HiSeq 2500 en el sitio web de Illumina para obtener más información acerca de la duración y otras especificaciones de rendimiento.

Consumibles para secuenciación de HiSeq v4

Nombre del kit HiSeq v4	Descripción
HiSeq SBS Kit v4	Contiene reactivos SBS que se utilizan en el HiSeq 2500.
HiSeq PE Cluster Kit v4 o HiSeq SR Cluster Kit v4	Contiene reactivos de agrupación que se utilizan en el cBot y reactivos de indexación que se utilizan en el HiSeq 2500. La versión PE del kit de generación de grupos incluye reactivos "paired-end" que se utilizan en el HiSeq 2500. Cada kit de generación de grupos incluye un kit de accesorios que contiene repuestos de la junta de celda de flujo y tapas de embudo para las botellas de reactivo SBS.

Pasos de preparación de los reactivos

Antes de configurar el experimento, prepare los reactivos SBS, los reactivos de indexación y los reactivos "paired-end" si procede.

- Para la preparación de los reactivos SBS, consulte la *HiSeq SBS Kit v4 Reference Guide* (Guía de referencia de HiSeq SBS Kit v4), n.º de referencia 15050108.
- Para la preparación de reactivos "paired-end" y de indexación, consulte la *HiSeq Cluster Kit v4 Reference Guide* (Guía de referencia de HiSeq Cluster Kit v4), n.º de referencia 15050104.

Antes de configurar el experimento, prepare todos los reactivos. Cuando se lo solicite el software de control, cargue todos los reactivos. Si utiliza la química de HiSeq v4, no tendrá que volver al instrumento durante el experimento para cargar los reactivos.

Flujo de trabajo de secuenciación de HiSeq v4

Prepare los reactivos para el experimento. Tras su preparación, pese los reactivos.

Para obtener información sobre la preparación de los reactivos, consulte *Pasos de preparación de los reactivos* en la página 22.

Con el software de control, introduzca los parámetros del experimento.

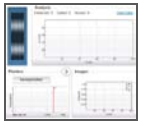
Cuando se le solicite, cargue todos los reactivos para el experimento:

- Cargue los reactivos SBS para la Lectura 1 y la Lectura 2.
- Para los experimentos indexados, cargue los reactivos de indexación.
- Para los experimentos "paired-end", cargue los reactivos "paired-end".

Con una celda de flujo usada en el instrumento, confirme el flujo correcto.

Cebe los reactivos SBS y mida los residuos de cebado.

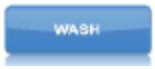
Cargue la celda de flujo agrupada para secuenciación. Confirme el flujo correcto.



Inicie el experimento de secuenciación.

[Opcional] Después del ciclo 1, revise el informe de primera base y, después, continúe con la Lectura 1.

El experimento continúa como se ha especificado en los parámetros del experimento.



Una vez finalizado el experimento, descargue y pese los reactivos.

Lave el instrumento.

Tipos de experimentos para química de HiSeq v4

En la siguiente tabla se muestran los tipos de experimentos de secuenciación y el número de ciclos posibles para cada lectura cuando se utiliza la química de HiSeq v4. Utilice esta información a modo de referencia a la hora de configurar el experimento.

Tipo de experimento	Ciclos de Lectura 1	Ciclos de lectura de índice 1 (i7)	Ciclos de lectura de índice 2 (i5)	Ciclos de Lectura 2	Total de ciclos
Lectura individual, no indexada	≤ 126	--	--	--	≤ 126
Lectura individual, un solo índice	≤ 126	6 o 7 [1] 8 [2]	--	--	≤ 133 [1] ≤ 134 [2]
Lectura individual, doble índice	≤ 126	8	8	--	≤ 142
"Paired-end", no indexada	≤ 126	--	--	≤ 126	≤ 252
"Paired-end", un solo índice	≤ 126	7 [1] 8 [2]	--	≤ 126	≤ 259 [1] ≤ 260 [2]
"Paired-end", doble índice	≤ 126	8	7 + 8 [3]	≤ 126	≤ 275

[1] Número de ciclos para bibliotecas de un solo índice.
[2] Número de ciclos para bibliotecas de doble índice.
[3] La lectura de índice 2 de un experimento de doble índice "paired-end" incluye siete ciclos de solo química adicionales.

Introducción de parámetros del experimento

En la pantalla de bienvenida, seleccione **Sequence** | **New Run** (Secuenciar | Nuevo experimento).

La interfaz del software de control le guía por los pasos de configuración del experimento. Los pasos de configuración del experimento se organizan en tres pestañas: Run Configuration (Configuración del experimento), Pre-Run Setup (Configuración previa al experimento) e Initiate Run (Iniciar experimento).

- Las pantallas de configuración del experimento contienen listas desplegables, casillas de verificación o campos de texto para los parámetros del experimento. Utilice el lector de códigos de barras portátil para leer el ID del kit de reactivos o de la celda de flujo, o introduzca el ID con ayuda del teclado táctil. El icono de teclado se encuentra a la derecha de los campos de texto.
- Seleccione **Next** (Siguiente) para pasar a la siguiente pantalla o seleccione **Back** (Atrás) para volver a la pantalla anterior.
- En cualquier momento durante los pasos de configuración del experimento, puede seleccionar **Cancel** (Cancelar) para abandonar la configuración del experimento y volver a la pantalla Welcome (Bienvenida).

Pantalla de integración

La pantalla de integración permite conectar el experimento a BaseSpace.

Para conectarlo a BaseSpace, realice lo siguiente:

1. Seleccione **BaseSpace**.
2. Seleccione una de las siguientes opciones de BaseSpace:
   - **Storage and Analysis** (Almacenamiento y análisis): Envía los datos del experimento a BaseSpace para la supervisión remota y el análisis de los datos. Con esta opción, se precisa una hoja de muestras.
   - **Run Monitoring Only** (Solo supervisión del experimento): Envía solamente los archivos InterOp a BaseSpace, lo que le permite supervisar el experimento de forma remota.
3. Inicie sesión en BaseSpace con su correo electrónico y la contraseña de la cuenta de MyIllumina.
4. Seleccione **Next** (Siguiente).

Para continuar sin conexión a BaseSpace, realice lo siguiente:

1 Seleccione **None** (Ninguno).

2 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de almacenamiento

1 Seleccione la casilla de verificación **Save to an output folder** (Guardar en una carpeta de salida) y seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación de red deseada. Si el experimento está conectado a BaseSpace para almacenamiento y análisis, este campo es opcional.

2 Seleccione **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) para reducir el espacio de almacenamiento necesario. Si el experimento está conectado a BaseSpace, la opción **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) está seleccionada de forma predeterminada.

NOTA
El parámetro **Bin Q-Scores** (Agrupar puntuaciones Q) está activado de forma predeterminada para reducir el espacio de almacenamiento necesario. Este parámetro agrupa las puntuaciones de calidad de un rango de valores más amplio sin repercutir en la precisión ni el rendimiento.

3 Seleccione una de las siguientes opciones de Save Auxiliary Files (Guardar archivos auxiliares):

- **Save All Thumbnails** (Guardar todas las vistas en miniatura): Guarda todas las imágenes en miniatura. Una imagen en miniatura es una muestra de imágenes de muchas placas en cada columna de placas, o sector, combinada en una imagen en miniatura.
- **Save Tile Thumbnails** (Guardar vistas en miniatura de placa): Guarda las vistas en miniatura de las placas. Las vistas en miniatura de las placas representan una única placa en lugar de una muestra de placas en un sector.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración de la celda de flujo

La pantalla Flow Cell Setup (Configuración de la celda de flujo) registra información acerca de la celda de flujo utilizada en el experimento. Todos los campos son obligatorios.

1 Realice la lectura del código de barras de la celda de flujo o introduzca el ID (número del código de barras) de la celda de flujo que desea secuenciar. El ID de la celda de

flujo se utiliza para determinar el tipo de celda de flujo y la compatibilidad de los reactivos.

2 Confirme que el tipo de la celda de flujo sea la **celda de flujo de HiSeq v4**. El tipo de celda de flujo se selecciona de forma automática en función del ID de la celda de flujo.

3 Introduzca un nombre para el experimento. El nombre del experimento aparece en cada pantalla para ayudar a identificar el experimento en curso.

4 Introduzca un nombre de usuario.

5 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración avanzada

1 [Opcional] Seleccione la casilla de verificación **Confirm First Base** (Confirmar primera base).
Se genera un informe de primera base automáticamente para cada experimento. Al seleccionar esta opción se abre el informe de primera base antes de continuar con el experimento.

2 [Opcional] En las casillas de verificación de **Align to PhiX** (Alinear a PhiX), anule la selección de la casilla de verificación de los carriles que no contienen PhiX.
De forma predeterminada, se seleccionan todos los carriles para la alineación mediante el software de análisis en tiempo real.
También puede optar por seleccionar los carriles de la imagen de la celda de flujo para añadir o eliminar carriles para la alineación de PhiX.

NOTA
No se requiere ningún carril de control específico con HCS v2.2 ni RTA v1.18. Por lo tanto, la opción para asignar un carril de control no está disponible con esta configuración de software.

3 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de fórmulas

1 Seleccione de las siguientes opciones de Index Type (Tipo de índice):
- **No Index** (No indexado): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) no indexado.

- **Single Index** (Un solo índice): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) con una lectura de indexación.
- **Dual Index** (Doble índice): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) con dos lecturas de indexación.
- **Custom** (Personalizado): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) con un número de ciclos personalizado de lecturas del índice.

2 Si especifica la opción Dual Index (Doble índice) o Custom (Personalizado), seleccione un formato de celda de flujo: bien **Single Read** (Lectura única) o bien **Paired End**.

3 Introduzca el número de ciclos para la Lectura 1 y la Lectura 2, según sea necesario.

NOTA
El número de ciclos realizados en una lectura es de un ciclo más que el número de ciclos analizados. Por ejemplo, para realizar 125 ciclos para la Lectura 1, introduzca 126.

Para la opción de indexación **Custom** (Personalizado), introduzca el número de ciclos para las lecturas del índice. Las longitudes de lectura no tienen por qué ser idénticas.

4 Confirme los siguientes parámetros de química predeterminados. Estos campos se completan automáticamente en función de la opción de tipo de índice seleccionada.
   a **SBS**: **HiSeq SBS Kit v4**
   b **Index** (Índice): **HiSeq v4 Single Index** (Un solo índice de HiSeq v4) o **HiSeq v4 Dual Index** (Doble índice de HiSeq v4)
   c **PE turnaround** (Respuesta PE): **HiSeq PE Cluster Kit v4**

5 [Opcional] Seleccione la casilla de verificación **Use Existing Recipe** (Usar fórmula existente) para utilizar una fórmula personalizada. También puede dejar que el software cree la fórmula a partir de los parámetros del experimento introducidos.

Pantalla de hoja de muestras

Las hojas de muestras son opcionales, a menos que utilice BaseSpace para realizar análisis de datos o ejecutar un experimento indexado.

1 Seleccione **Browse** (Examinar) para navegar hasta la ubicación de la hoja de muestras.

2 Seleccione **Next** (Siguiente).

NOTA
El software de control de HiSeq v2.2 permite un esquema de indexación diferente en cada carril.

Pantalla de reactivos

La pantalla Reagents (Reactivos) registra información sobre los kits de reactivos utilizados para el experimento. El ID del kit de reactivos (el número de código de barras comienza por **RGT**) se utiliza para determinar el tipo del kit de reactivos y la compatibilidad con los modos de experimento.

1. Realice una lectura o introduzca el ID del kit de reactivos SBS.
2. En el caso de los experimentos "paired-end", lea o introduzca el ID del kit de reactivos del kit de generación de grupos "paired-end".
3. Seleccione el kit de reactivos SBS para el experimento:
   - Seleccione **250 Cycles** (250 ciclos) para un kit de 250 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 275 de forma predeterminada.
   - Seleccione **50 Cycles** (50 ciclos) para un kit de 50 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 74 de forma predeterminada.
   - Seleccione **Custom** (Personalizar) para un kit parcial o varios kits de 50 ciclos. En el campo Cycles Remaining (Ciclos restantes), introduzca el número de ciclos SBS que se espera que duren los reactivos.

   NOTA
   En el caso de los kits parciales, el software cuenta el número de ciclos introducidos. Cuando los ciclos están en un nivel bajo, el software le solicita cargar reactivos nuevos.
4. Seleccione **Prime SBS Reagents** (Cebar reactivos SBS) para cebar los reactivos antes de comenzar un experimento. Cebe siempre los reactivos antes de cargar una nueva celda de flujo.
5. Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de revisión

1. Revise los parámetros del experimento en la pantalla Review (Revisión).
2. Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar o seleccione **Back** (Atrás) para modificar los parámetros.

Carga y cebado de reactivos

Tras introducir los parámetros del experimento, cargue los reactivos SBS, "paired-end" y de indexación para el experimento. A continuación, cebe los reactivos con el sistema de fluídica. El software le guía a través de estos pasos mediante una serie de pantallas en la pestaña Pre-Run Setup (Configuración previa al experimento).

Consumibles proporcionados por Illumina

- 8 tapas de embudo

Consumibles proporcionados por el usuario

- Botella de 250 ml (Corning, n.º de catálogo 430776)
- Tubos cónicos de 15 ml (Corning, n.º de catálogo 430052)
- Agua de laboratorio

NOTA
Para preparar el enjuague posterior al experimento al final del experimento de secuenciación, cargue 25 ml de PW1 o agua de laboratorio en la posición 2.

El enjuague posterior al experimento ***no*** sustituye al lavado del instrumento posterior al experimento.

Carga de reactivos SBS

1. Invierta cada botella varias veces para asegurarse de que los reactivos se mezclan bien.
2. Retire la tapa de cada botella de reactivo y sustitúyala por una tapa de embudo.

PRECAUCIÓN
Después de manipular la botella de CRM, asegúrese de desechar sus guantes y sustituirlos por un par nuevo.

3. Registre el peso de cada reactivo en el formulario de seguimiento del laboratorio.

NOTA
Pesar los reactivos antes y después de un experimento de secuenciación sirve para confirmar la administración correcta de los reactivos.

4. Abra la puerta del compartimento de reactivos.
5. Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos de secuenciación con el siguiente movimiento:

a Tire del mango hacia usted y, a continuación, levántelo.
b Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango del dispensador se encuentre colocado de forma segura en la ranura.

6 Deslice la gradilla de reactivos para extraerla del compartimento de reactivos.

7 Coloque cada una de las botellas de reactivo en la gradilla, en la posición numerada correspondiente. Asegúrese de que el extremo cónico de la botella esté apoyado en la muesca de la base de la gradilla.

Tabla 1 Posiciones de los reactivos

Posición	Reactivo	Descripción
1	IRM	Reactivo de mezcla maestra para incorporación
2	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio
3	USM	Mezcla de lectura universal
4	Tampón de SBS 1 (SB1)	Tampón de alto contenido en sal
5	Tampón de SBS 2 (SB2)	Tampón de lavado de incorporación
6	Tampón de SBS 2 (SB2)	Tampón de lavado de incorporación
7	CRM	Mezcla de reactivo para clivaje
8	Tampón de SBS 3 (SB3)	Tampón de clivaje

8 Añada 25 ml de PW1 o agua de laboratorio a la botella de la posición 2.

9 Deslice la gradilla de reactivos dentro del compartimento de reactivos y alinee la gradilla con la guía elevada en el suelo del compartimento.

10 Baje los dispensadores e introdúzcalos en las botellas de reactivos de secuenciación como se indica a continuación:
a Tire del mango del dispensador hacia usted y, a continuación, bájelo.
b Inspeccione visualmente los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en las tapas de embudo.
c Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo inferior del canal.

11 Seleccione la casilla de verificación **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] cargada).

Carga de reactivos de indexación

1 Registre el peso de cada reactivo en el formulario de seguimiento del laboratorio.

2 Asegúrese de que la gradilla "paired-end" no se esté utilizando en la celda de flujo contigua. Los pasos que utilizan la gradilla "paired-end" incluyen la resíntesis de la Lectura 2, la preparación de la lectura del Índice 1 (i7) y la preparación de la lectura del Índice 2 (i5).

3 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos "paired-end" con el siguiente movimiento:
   a Tire del mango hacia usted y, a continuación, levántelo.
   b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.

4 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.

5 Retire las tapas de todos los tubos de reactivos y coloque el tubo en la gradilla en la posición numerada asociada o el color de la etiqueta correspondiente.

Tabla 2 Celdas de flujo de lectura individual

Posición	Reactivo	Descripción
15	FDR	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
16	HP9*	Cebador para secuenciación del índice i5
17	HP12	Cebador de secuenciación del índice i7

* Se requiere HP9 solamente para experimentos de doble índice. Si no se utiliza HP9, cargue un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de agua de laboratorio en la posición 16.

Tabla 3 Celdas de flujo "paired-end"

Posición	Reactivo	Descripción
10	FRM *	Mezcla para resíntesis rápida
15	FDR	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
17	HP12	Cebador de secuenciación del índice i7

* Prepare el FMR en la posición 10 para experimentos de doble índice en una celda de flujo "paired-end". Se debe colocar FRM en la posición 10 para todos los experimentos "paired-end" independientemente de las opciones de indexación.

6 Si está realizando un experimento "single-read" (de lectura individual), continúe con los siguientes pasos para devolver la gradilla al compartimento de reactivos. De lo contrario, continúe con la carga de los reactivos "paired-end".

7 Coloque tubos cónicos de 15 ml con 10 ml de agua de laboratorio en posiciones que no

se estén utilizando de la gradilla "paired-end".

8 Deslice la gradilla de reactivos dentro del compartimento de reactivos y alinee la gradilla con la guía elevada en el suelo del compartimento.

9 Si va a realizar un experimento "single-read" (de lectura individual), baje los dispensadores e introdúzcalos en los tubos de reactivos "paired-end" de la siguiente manera:
   a Tire del mango hacia usted y, a continuación, bájelo.
   b Inspeccione visualmente los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en los tubos.
   c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.

10 Seleccione **Next** (Siguiente).

Carga de reactivos "paired-end"

1 Registre el peso de cada reactivo en el formulario de seguimiento del laboratorio.

2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos "paired-end" con el siguiente movimiento:
   a Tire del mango hacia usted y, a continuación, levántelo.
   b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.

3 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.

4 Retire las tapas de todos los tubos de reactivos y coloque el tubo en la gradilla en la posición numerada asociada o el color de la etiqueta correspondiente.

Tabla 4 Celdas de flujo "paired-end"

Posición	Reactivo	Descripción
10	FRM *	Mezcla para resíntesis rápida
11	FLM2	Mezcla para linealización 2
13	AMS	Mezcla para amplificación rápida
14	FPM	Premezcla de amplificación rápida
15	FDR *	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
16	HP11	Cebador de secuenciación de la Lectura 2

* Si ha cargado reactivos de indexado para un experimento de un solo índice, FDR ya se encuentra cargada en la posición 10. Si ha cargado los reactivos de indexado para un experimento de doble índice, FRM y FDR ya se encuentran cargadas en las posiciones 10 y 15, respectivamente.

5 Coloque tubos cónicos de 15 ml con 10 ml de agua de laboratorio en posiciones que no se estén utilizando de la gradilla "paired-end".

6 Deslice la gradilla de reactivos dentro del compartimento de reactivos y alinee la gradilla con la guía elevada en el suelo del compartimento.

7 Baje los dispensadores e introdúzcalos en los tubos de reactivos "paired-end" del siguiente modo:
   a Tire del mango hacia usted y, a continuación, bájelo.
   b Inspeccione visualmente los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en los tubos.
   c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.

8 Seleccione **Next** (Siguiente).

Cebado de reactivos

Entre los pasos para cebar reactivos se incluyen los siguientes: limpieza del soporte de la celda de flujo, carga de una celda de flujo para el cebado, confirmación de flujo correcto e inicio del cebado.

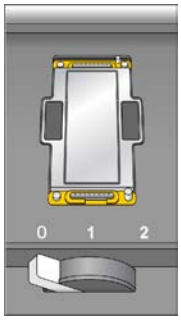
Limpieza del soporte de la celda de flujo

1 Abra la puerta del compartimento de la celda de flujo.

PRECAUCIÓN
No coloque líquidos sobre la puerta del compartimento de la celda de flujo o en la platina de la celda de flujo cuando la puerta esté abierta. Los derrames en esta zona pueden dañar el instrumento.

2 Compruebe que la palanca de la celda de flujo está en posición OFF (Desactivada).

Figura 10 Palanca de la celda de flujo en posición 0



3 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.

4 En caso de presencia de la celda de flujo de un experimento anterior, retírela y resérvela en un tubo de tampón de almacenamiento o agua de laboratorio para evitar que se seque. Se puede utilizar para confirmar un flujo adecuado antes de cargar la celda de flujo agrupada.

5 Con un paño humedecido en alcohol o una toallita sin pelusa humedecida en etanol o isopropanol, limpie con cuidado la superficie del soporte de la celda de flujo hasta que esté limpia.

PRECAUCIÓN
Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío ni alrededor de los distribuidores. Si es necesario, utilice una toallita de laboratorio sin pelusa para secar la platina.

6 Inspeccione visualmente el soporte de la celda de flujo para comprobar que no hay pelusas ni obstrucciones en los orificios de vacío.

Figura 11 Ubicaciones de los orificios de vacío

Carga de una celda de flujo para el cebado

En la pantalla Load Prime Flow Cell (Cargar celda de flujo para el cebado), cargue la celda de flujo ***usada*** para el cebado. Tras cargar la celda de flujo usada, compruebe que la función de vacío esté activada.

NOTA
Illumina recomienda utilizar la celda de flujo de un experimento anterior para el cebado de reactivos en un experimento posterior o para un lavado posterior a un experimento.

1 Enjuague la celda de flujo usada con agua de laboratorio. Seque la celda de flujo con una toallita para limpiar lentes o una toallita sin pelusa.

2 Limpie la celda de flujo con paños humedecidos en alcohol y una toallita para limpiar lentes.

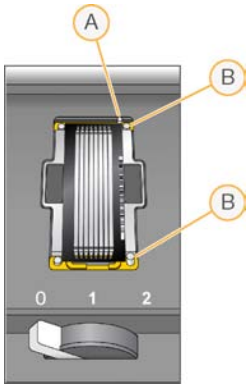
NOTA
No extraiga ni sustituya las juntas de la celda de flujo durante este paso.

3 Coloque la celda de flujo usada en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia ***abajo*** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.

4 Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y derechos, hasta que se detenga.

NOTA
Retire las manos de la celda de flujo antes de accionar el interruptor de vacío para evitar posibles desvíos posteriores en la alineación.

Figura 12 Colocación de la celda de flujo contra los pasadores guía superiores y derechos



A Pasador guía superior
B Pasadores guía derechos

5 Mueva con cuidado la palanca de la celda de flujo a la posición 1, lo que activará el vacío y fijará la celda de flujo en su posición. Cuando la palanca de la celda de flujo parpadee emitiendo una luz verde, significa que el vacío está activado. Si la palanca no muestra luz verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos* en la página 149.

Figura 13 Palanca de la celda de flujo en posición 1

6 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2 (extremo derecho). Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo está lista para usarse.

Figura 14 Palanca de la celda de flujo en posición 2

7 Asegúrese de marcar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) en la pantalla de carga de la celda de flujo para el cebado y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

Confirmación de flujo correcto

Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y el distribuidor está acoplado.

1 Seleccione la solución 2 (agua de laboratorio) de la lista desplegable.

PRECAUCIÓN
Utilice agua para confirmar que el flujo es correcto solo en una celda de flujo usada. No use nunca agua para confirmar que el flujo es correcto en una celda de flujo agrupada.

2 Confirme los siguientes valores predeterminados:
- Volume (Volumen): **125**
- Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **250**
- Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**

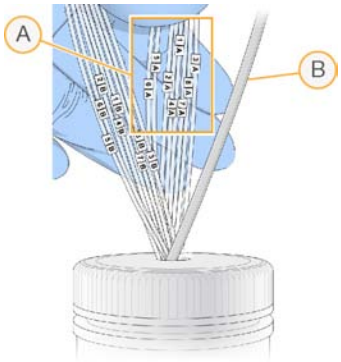
3 Seleccione **Pump** (Dispensar).

4 Inspeccione visualmente la celda de flujo para comprobar si hay burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.
Si detecta una presencia excesiva de burbujas, compruebe si las juntas están obstruidas, reduzca la velocidad de aspiración a 100 y bombee otros 125 µl de agua a la celda de flujo. Si el problema persiste, retire la celda de flujo, repita los pasos de limpieza y vuelva a cargarla.

Colocación de los tubos e inicio del cebado

1 Retire los ocho tubos de residuos de la celda de flujo apropiada del contenedor de residuos.
No incluya los ocho tubos de la celda de flujo opuesta ni el tubo de la bomba de condensación.

Figura 15 Colocación de los tubos



A Tubos de residuos de la celda de flujo para las posiciones de los reactivos 1–8
B Tubo de la bomba de condensación (no retirar)

2 Coloque los tubos de residuos en un tubo de 15 ml vacío, es decir, un tubo de residuos por cada tubo de 15 ml. El residuo de cebado se recoge y se mide después del paso de cebado.

3 Seleccione **Start Prime** (Iniciar cebado). Se abre la pantalla de cebado y se inicia el paso de cebado. Supervise el progreso del cebado en la pantalla de cebado.

4 Al finalizar el paso de cebado, mida el residuo obtenido y compruebe que el volumen en cada tubo sea de 1,75 ml para un total de **14 ml**. El total se calcula de la siguiente forma:
- 250 µl para cada posición SBS salvo la posición 2 (250 x 7 = 1,75 ml)
- 1,75 ml para cada carril (1,75 x 8 = 14 ml)

5 Registre los resultados en el formulario de seguimiento del laboratorio.

6 Antes de continuar, vuelva a colocar los tubos de residuos en el contenedor de residuos.

7 Seleccione **Next** (Siguiente).

Carga de una celda de flujo

Entre los pasos para cargar la celda de flujo agrupada se incluyen los siguientes: la extracción de la celda de flujo para el cebado, la limpieza del soporte de la celda de flujo, la limpieza de la celda de flujo, la carga de la celda de flujo y la confirmación del flujo correcto.

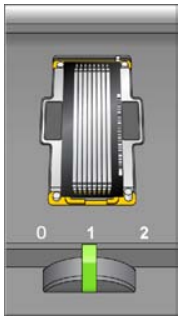
Consumibles proporcionados por el usuario

- Toallita para limpiar lentes
- Paños humedecidos en alcohol o etanol al 70 %
- Toallita de laboratorio sin pelusa
- Un par de pinzas hemostáticas de plástico

Retirada de la celda de flujo usada

1 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para desacoplar los distribuidores.

Figura 16 Palanca de la celda de flujo en posición 1



2 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 0 para desacoplar la junta de vacío y desbloquear la celda de flujo.

Figura 17 Palanca de la celda de flujo en posición 0

3 Levante la celda de flujo usada del soporte de la celda de flujo.

Limpieza del soporte de la celda de flujo

1 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.

2 Con un paño humedecido en alcohol o una toallita sin pelusa humedecida en etanol o isopropanol, limpie con cuidado la superficie del soporte de la celda de flujo hasta que esté limpia.

PRECAUCIÓN
Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío ni alrededor de los distribuidores. Si es necesario, utilice una toallita de laboratorio sin pelusa para secar la platina.

Figura 18 Inspección de los orificios de vacío

3 Inspeccione visualmente el soporte de la celda de flujo para comprobar que no hay pelusas ni obstrucciones en los orificios de vacío.

Limpieza de la celda de flujo

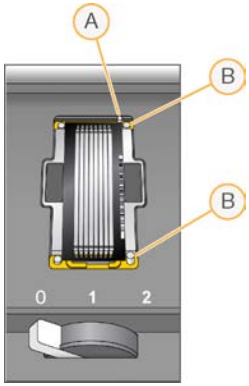
1. Extraiga la celda de flujo del contenedor de la celda de flujo con un par de pinzas hemostáticas de plástico.
2. Enjuague la celda de flujo con agua de laboratorio y séquela con una toallita para limpiar lentes.
3. Doble un paño humedecido en alcohol hasta que tenga el tamaño aproximado de la celda de flujo.
4. Sujete con dos dedos los extremos de la celda de flujo agrupada. Asegúrese de que los puertos de entrada y salida están boca ***arriba***.
5. Limpie cada lado de la celda de flujo con un solo movimiento de arrastre. Repita, doblando el paño después de cada pasada, hasta que la celda de flujo quede limpia.
6. Seque la celda de flujo con una toallita para limpiar lentes seca.
7. Proteja la celda de flujo del polvo hasta que vaya a cargarla en el instrumento.

Carga de la celda de flujo de secuenciación

NOTA
No sustituya las juntas del distribuidor. Sustituya las juntas del distribuidor cuando el experimento de secuenciación haya finalizado y antes del lavado de mantenimiento.

1. Coloque la celda de flujo en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia ***abajo*** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo señale al instrumento.
2. Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y derechos, hasta que se detenga.

Figura 19 Colocación de la celda de flujo contra los pasadores guía superiores y derechos

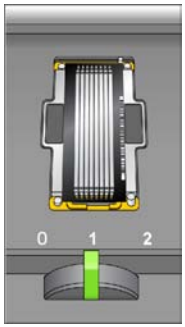


A Pasador guía superior
B Pasadores guía derechos

NOTA
Retire las manos de la celda de flujo antes de accionar el interruptor de vacío para evitar posibles desvíos posteriores en la alineación.

3 Mueva con cuidado la palanca de la celda de flujo a la posición 1, lo que activará el vacío y fijará la celda de flujo en su posición. Cuando la palanca de la celda de flujo parpadee emitiendo una luz verde, significa que el vacío está activado. Si la palanca no muestra luz verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos* en la página 149.

Figura 20 Palanca de la celda de flujo en posición 1



4 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2. Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo está lista para usarse.

Figura 21 Palanca de la celda de flujo en posición 2

5 Asegúrese de seleccionar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) en la pantalla Load Sequencing Flow Cell (Cargar celda de flujo de secuenciación).

Confirmación de flujo correcto

Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y el distribuidor está acoplado.

1 Seleccione la solución 5 en la lista desplegable.

2 Introduzca los siguientes valores predeterminados:
- Volume (Volumen): **250**
- Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **250**
- Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**

3 Seleccione **Pump** (Dispensar).

4 Inspeccione visualmente la celda de flujo para detectar burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.
Si detecta un exceso de burbujas, compruebe las juntas del distribuidor para detectar obstrucciones y repita el proceso con la solución 6 para evitar la eliminación de la posición 5. Reduzca la velocidad de aspiración a 100 y dispense otros 250 µl a la celda de flujo.

5 Seleccione **Next** (Siguiente). Asegúrese de que la palanca de la celda de flujo está de color verde y, a continuación, cierre la puerta del compartimento de la celda de flujo.

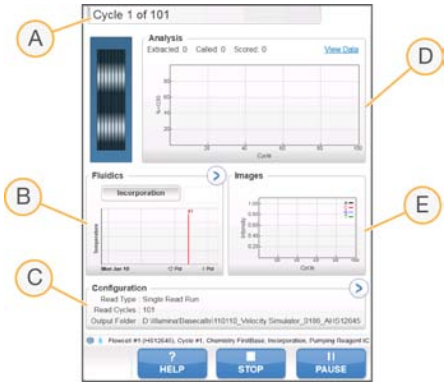
6 Confirme que las casillas de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y **Door Closed** (Puerta cerrada) están seleccionadas y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

7 Seleccione **Start** (Iniciar) para comenzar el experimento de secuenciación.

Monitorización del experimento

Supervise los criterios de medición del experimento que aparecen en la pantalla de resumen del experimento, la fluídica y la adquisición de imágenes.

Figura 22 Pantalla de resumen del experimento



A **Barra de progreso:** Utilice la barra de progreso para supervisar el número de ciclos que han finalizado.

B **Gráfico de fluídica:** Amplíe la sección de fluídica para supervisar los pasos de análisis químico.

C **Configuración del experimento:** Consulte los parámetros del experimento actual.

D **Gráfico de análisis:** Utilice el gráfico de análisis para supervisar las puntuaciones de calidad por ciclo.

E **Gráfico de imágenes:** Utilice el gráfico de imágenes para supervisar las intensidades por ciclo.

Informe de primera base

Si ha seleccionado la opción **Confirm First Base** (Confirmar primera base) durante la configuración del experimento, se abrirá el cuadro de diálogo de confirmación de primera base automáticamente tras finalizar la adquisición de imágenes del primer ciclo. El experimento se pone en pausa en este paso.

1 Revise el informe de primera base del cuadro de diálogo de confirmación.

2 Si los resultados son satisfactorios, seleccione **Continue** (Continuar).

Procedimientos posteriores al experimento

Una vez finalizado el experimento, descargue y pese los reactivos y, a continuación, lave el instrumento. Si desea obtener más información, consulte *Procedimientos posteriores al experimento* en la página 115.

Capítulo 3

Realización de un experimento de TruSeq v3

Introducción 50
Flujo de trabajo de la secuenciación de TruSeq v3 52
Tipos de experimentos para química de TruSeq v3 54
Introducción de parámetros del experimento 55
Carga y cebado de reactivos 61
Carga de una celda de flujo 71
Monitorización del experimento 77
Preparación de reactivos para la Lectura 2 79
Carga de reactivos para la Lectura 2 80

Introducción

Para realizar un experimento de TruSeq v3 en el HiSeq 2500, prepare reactivos SBS para la Lectura 1 y reactivos de indexación antes de configurar el experimento. Siga las indicaciones del software para configurar el experimento. Entre ellas, se incluyen la introducción de los parámetros del experimento, la carga y el cebado de los reactivos, la carga de la celda de flujo y la realización de una comprobación de fluídica.

Prepare y cargue reactivos "paired-end" y reactivos SBS para la Lectura 2 una vez finalizada la Lectura 1 y las lecturas del índice.

Visite la página de especificaciones de HiSeq 2500 en el sitio web de Illumina para obtener más información acerca de la duración y otras especificaciones de rendimiento.

Consumibles para secuenciación de TruSeq v3

Nombre del kit TruSeq v3	Descripción
TruSeq SBS Kit v3 (200 ciclos) o TruSeq SBS Kit v3 (50 ciclos)	Contiene reactivos SBS que se utilizan en el HiSeq 2500.
TruSeq PE Cluster Kit v3 o TruSeq SR Cluster Kit v3	Contiene reactivos de agrupación que se utilizan en el cBot y reactivos de indexación que se utilizan en el HiSeq 2500. La versión PE del kit de generación de grupos incluye reactivos "paired-end" que se utilizan en el HiSeq 2500. Cada kit de generación de grupos incluye un kit de accesorios que contiene repuestos de la junta de celda de flujo y tapas de embudo para las botellas de reactivo SBS.

Pasos de preparación de los reactivos

- Para la preparación de reactivos SBS, consulte la guía correspondiente:
  - *TruSeq SBS Kit v3 Reagent Prep Guide (200 Cycles) (Guía de preparación de reactivos de TruSeq SBS Kit v3 [200 ciclos]), n.º de referencia 15023333*
  - *TruSeq SBS Kit v3 Reagent Prep Guide (50 Cycles) (Guía de preparación de reactivos de TruSeq SBS Kit v3 [50 ciclos]), n.º de referencia 15023334*
- Para la preparación de reactivos "paired-end" y de indexación, consulte la guía correspondiente:

- *TruSeq PE Cluster Kit v3 Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de TruSeq PE Cluster Kit v3), n.º de referencia 15023336*
- *TruSeq SR Cluster Kit v3 Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de TruSeq SR Cluster Kit v3), n.º de referencia 15023335*

Estas guías incluyen instrucciones para preparar los cebadores de secuenciación incluidos en la caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Flujo de trabajo de la secuenciación de TruSeq v3

Prepare los reactivos SBS para los reactivos de indexación y la Lectura 1. Tras su preparación, pese los reactivos.

Para obtener información sobre la preparación de los reactivos, consulte *Pasos de preparación de los reactivos* en la página 50.

Con el software de control, introduzca los parámetros del experimento.

Cuando se le solicite, cargue todos los reactivos SBS para la Lectura 1.

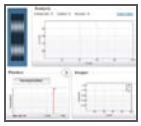
Cargue los reactivos SBS para la Lectura 2, excepto ICB.

Cargue los reactivos de indexación.

Con una celda de flujo usada en el instrumento, confirme el flujo correcto.

Cebe los reactivos SBS y mida los residuos de cebado.

Cargue la celda de flujo agrupada para secuenciación. Confirme el flujo correcto.



Inicie el experimento de secuenciación.

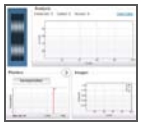
[Opcional] Después del ciclo 1, revise el informe de primera base y, después, continúe con la Lectura 1.

El experimento continúa como se ha especificado en los parámetros del experimento.

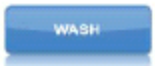
Prepare los reactivos "paired-end" y el ICB nuevo para la Lectura 2. Pese los reactivos tras la preparación.

Para obtener información sobre la preparación de los reactivos, consulte *Pasos de preparación de los reactivos* en la página 50.

Cargue los reactivos "paired-end" y el ICB nuevo para la Lectura 2.



Continúe el experimento. El software ceba automáticamente los reactivos "paired-end" y realiza la resíntesis de la Lectura 2 y la Lectura 2.



Una vez finalizado el experimento, descargue y pese los reactivos. Lave el instrumento.

Tipos de experimentos para química de TruSeq v3

En la siguiente tabla se muestran los tipos de experimentos de secuenciación y el número de ciclos posibles para cada lectura cuando se utiliza la química de TruSeq v3. Utilice esta información a modo de referencia a la hora de configurar el experimento.

Tipo de experimento	Ciclos de Lectura 1	Ciclos de lectura de índice 1 (i7)	Ciclos de lectura de índice 2 (i5)	Ciclos de Lectura 2	Total de ciclos
Lectura individual, no indexada	≤ 101	--	--	--	≤ 101
Lectura individual, un solo índice	≤ 101	6 o 7 [1] 8 [2]	--	--	≤ 108 [1] ≤ 109 [2]
Lectura individual, doble índice	≤ 101	8	8	--	≤ 117
"Paired-end", no indexada	≤ 101	--	--	≤ 101	≤ 202
"Paired-end", un solo índice	≤ 101	7 [1] 8 [2]	--	≤ 101	≤ 209 [1] ≤ 210 [2]
"Paired-end", doble índice	≤ 101	8	7 + 8 [3]	≤ 101	≤ 225

[1] Número de ciclos para bibliotecas de un solo índice.
[2] Número de ciclos para bibliotecas de doble índice.
[3] La lectura de índice 2 de un experimento de doble índice "paired-end" incluye siete ciclos de solo química adicionales.

Introducción de parámetros del experimento

En la pantalla de bienvenida, seleccione **Sequence** | **New Run** (Secuenciar | Nuevo experimento).

La interfaz del software de control le guía por los pasos de configuración del experimento. Los pasos de configuración del experimento se organizan en tres pestañas: Run Configuration (Configuración del experimento), Pre-Run Setup (Configuración previa al experimento) e Initiate Run (Iniciar experimento).

- Las pantallas de configuración del experimento contienen listas desplegables, casillas de verificación o campos de texto para los parámetros del experimento. Utilice el lector de códigos de barras portátil para leer el ID del kit de reactivos o de la celda de flujo, o introduzca el ID con ayuda del teclado táctil. El icono de teclado se encuentra a la derecha de los campos de texto.
- Seleccione **Next** (Siguiente) para pasar a la siguiente pantalla o seleccione **Back** (Atrás) para volver a la pantalla anterior.
- En cualquier momento durante los pasos de configuración del experimento, puede seleccionar **Cancel** (Cancelar) para abandonar la configuración del experimento y volver a la pantalla Welcome (Bienvenida).

Pantalla de integración

La pantalla de integración permite conectar el experimento a BaseSpace.

Para conectarlo a BaseSpace, realice lo siguiente:

1. Seleccione **BaseSpace**.
2. Seleccione una de las siguientes opciones de BaseSpace:
   - **Storage and Analysis** (Almacenamiento y análisis): Envía los datos del experimento a BaseSpace para la supervisión remota y el análisis de los datos. Con esta opción, se precisa una hoja de muestras.
   - **Run Monitoring Only** (Solo supervisión del experimento): Envía solamente los archivos InterOp a BaseSpace, lo que le permite supervisar el experimento de forma remota.
3. Inicie sesión en BaseSpace con su correo electrónico y la contraseña de la cuenta de MyIllumina.
4. Seleccione **Next** (Siguiente).

Para continuar sin conexión a BaseSpace, realice lo siguiente:

1 Seleccione **None** (Ninguno).

2 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de almacenamiento

1 Seleccione la casilla de verificación **Save to an output folder** (Guardar en una carpeta de salida) y seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación de red deseada. Si el experimento está conectado a BaseSpace para almacenamiento y análisis, este campo es opcional.

2 Seleccione **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) para reducir el espacio de almacenamiento necesario. Si el experimento está conectado a BaseSpace, la opción **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) está seleccionada de forma predeterminada.

NOTA
El parámetro **Bin Q-Scores** (Agrupar puntuaciones Q) está activado de forma predeterminada para reducir el espacio de almacenamiento necesario. Este parámetro agrupa las puntuaciones de calidad de un rango de valores más amplio sin repercutir en la precisión ni el rendimiento.

3 Seleccione una de las siguientes opciones de Save Auxiliary Files (Guardar archivos auxiliares):

- **Save All Thumbnails** (Guardar todas las vistas en miniatura): Guarda todas las imágenes en miniatura. Una imagen en miniatura es una muestra de imágenes de muchas placas en cada columna de placas, o sector, combinada en una imagen en miniatura.
- **Save Tile Thumbnails** (Guardar vistas en miniatura de placa): Guarda las vistas en miniatura de las placas. Las vistas en miniatura de las placas representan una única placa en lugar de una muestra de placas en un sector.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración de la celda de flujo

La pantalla Flow Cell Setup (Configuración de la celda de flujo) registra información acerca de la celda de flujo utilizada en el experimento.

1 Realice la lectura del código de barras de la celda de flujo o introduzca el ID (número del código de barras) de la celda de flujo que desea secuenciar. El ID de la celda de

flujo se utiliza para determinar el tipo de celda de flujo y la compatibilidad de los reactivos.

2 Confirme que el tipo de celda de flujo sea la **celda de flujo de HiSeq v3**, que se selecciona automáticamente según el ID de la celda de flujo.

3 Introduzca un nombre para el experimento. El nombre del experimento aparece en cada pantalla para ayudar a identificar el experimento en curso.

4 Introduzca un nombre de usuario.

5 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración avanzada

1 [Opcional] Seleccione la casilla de verificación **Confirm First Base** (Confirmar primera base).
Se genera un informe de primera base automáticamente para cada experimento. Al seleccionar esta opción se abre el informe de primera base antes de continuar con el experimento.

2 [Opcional] En las casillas de verificación de **Align to PhiX** (Alinear a PhiX), anule la selección de la casilla de verificación de los carriles que no contienen PhiX.
De forma predeterminada, se seleccionan todos los carriles para la alineación mediante Análisis en tiempo real (RTA).
También puede optar por seleccionar los carriles de la imagen de la celda de flujo para añadir o eliminar carriles para la alineación de PhiX.

NOTA
No se requiere ningún carril de control específico con HCS v2.2 ni RTA v1.18. Por lo tanto, la opción para asignar un carril de control no está disponible con esta configuración de software.

3 [Opcional] Seleccione **Keep Intensity Files** (Conservar archivos de intensidad) para volver a realizar análisis con posterioridad o personalizar el procesamiento.
De forma predeterminada, esta opción no está seleccionada. No es necesario guardar archivos de intensidad para el análisis integrado en el instrumento. Si activa esta opción, aumenta de forma considerable el tamaño de la carpeta de salida de datos.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de fórmulas

En la pantalla Recipe (Fórmula) se genera automáticamente una fórmula a partir de la información introducida.

1 Seleccione una de las siguientes opciones de Index Type (Tipo de índice):
- **No Index** (No indexado): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) no indexado.
- **Single Index** (Un solo índice): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) con una lectura de indexación.
- **Dual Index** (Doble índice): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) con dos lecturas de indexación.
- **Custom** (Personalizado): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) con un número de ciclos personalizado de lecturas del índice.

2 Si especifica la opción Dual Index (Doble índice) o Custom (Personalizado), seleccione un formato de celda de flujo: bien **Single Read** (Lectura única) o bien **Paired End**.

3 Introduzca el número de ciclos para la Lectura 1 y la Lectura 2, según sea necesario.

NOTA
El número de ciclos realizados en una lectura es de un ciclo más que el número de ciclos analizados. Por ejemplo, para realizar 125 ciclos para la Lectura 1, introduzca 126.

Para la opción de indexación **Custom** (Personalizado), introduzca el número de ciclos para las lecturas del índice. Las longitudes de lectura no tienen por qué ser idénticas.

4 Confirme los siguientes parámetros de química predeterminados. Estos campos se completan automáticamente en función de la opción de tipo de índice seleccionada.
a **SBS**: **TruSeq SBS Kit v3**
b **Index** (Índice): **TruSeq Multiplex Sequencing Primer Box** o **TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box**
c **PE turnaround** (Respuesta PE): **TruSeq PE Cluster Kit v3**

5 [Opcional] Seleccione la opción **Use Existing Recipe** (Usar fórmula existente) para utilizar una fórmula personalizada. También puede dejar que el software cree la fórmula a partir de los parámetros del experimento introducidos.

Pantalla de hoja de muestras

Las hojas de muestras son opcionales, a menos que utilice BaseSpace para realizar análisis de datos o ejecutar un experimento indexado.

1 Seleccione **Browse** (Examinar) para navegar hasta la ubicación de la hoja de muestras.

2 Seleccione **Next** (Siguiente).

NOTA
El software de control de HiSeq v2.2 permite un esquema de indexación diferente en cada carril.

Pantalla de reactivos

La pantalla Reagents (Reactivos) registra información sobre los kits de reactivos utilizados para el experimento. El ID del kit de reactivos (el número de código de barras comienza por **RGT**) se utiliza para determinar el tipo del kit de reactivos y la compatibilidad con los modos de experimento.

1 Realice una lectura o introduzca el ID del kit de reactivos SBS.

2 En el caso de los experimentos "paired-end", lea o introduzca el ID del kit de reactivos del kit de generación de grupos "paired-end".

3 Seleccione el kit de reactivos SBS para el experimento:

- Seleccione **200 Cycles** (200 ciclos) para un kit de 200 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 209 de forma predeterminada.
- Seleccione **50 Cycles** (50 ciclos) para un kit de 50 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 59 de forma predeterminada.
- Seleccione **Custom** (Personalizar) para un kit parcial o varios kits de 50 ciclos. En el campo Cycles Remaining (Ciclos restantes), introduzca el número de ciclos SBS que se espera que duren los reactivos.

NOTA
En el caso de los kits parciales, el software cuenta el número de ciclos introducidos. Cuando los ciclos están en un nivel bajo, el software le solicita cargar reactivos nuevos.

4 Seleccione **Prime SBS Reagents** (Cebar reactivos SBS) para cebar los reactivos antes de comenzar un experimento. Cebe siempre los reactivos antes de cargar una nueva celda de flujo.

5 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de revisión

1 Revise los parámetros del experimento en la pantalla Review (Revisión).

2 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar o seleccione **Back** (Atrás) para modificar los parámetros.

Carga y cebado de reactivos

Tras introducir los parámetros del experimento, cargue los reactivos SBS y de indexación para el experimento. A continuación, cebe los reactivos con el sistema de fluídica. El software le guiará a través de estos pasos mediante una serie de pantallas en la pestaña Pre-Run Setup (Configuración previa al experimento).

Consumibles proporcionados por Illumina

- Ocho tapas de embudo

Consumibles proporcionados por el usuario

- Botella de 250 ml (Corning, n.º de catálogo 430776)
- Tubos cónicos de 15 ml (Corning, n.º de catálogo 430052)
- Agua de laboratorio

NOTA

Para preparar el enjuague posterior al experimento al final del experimento de secuenciación, cargue 25 ml de PW1 o agua de laboratorio en la posición 2.

El enjuague posterior al experimento ***no*** sustituye al lavado del instrumento posterior al experimento.

Carga de reactivos SBS

1 Retire la tapa de cada botella de reactivo y sustitúyala por una tapa de embudo.

PRECAUCIÓN

Después de manipular la botella de CMR, asegúrese de desechar sus guantes y sustituirlos por un par nuevo.

2 Registre el peso de cada reactivo en el formulario de seguimiento del laboratorio.

NOTA

Pesar los reactivos antes y después de un experimento de secuenciación sirve para confirmar la administración correcta de los reactivos.

3 Abra la puerta del compartimento de reactivos.

4 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos de secuenciación con el siguiente movimiento:

a Tire del mango hacia usted y, a continuación, levántelo.
b Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango del dispensador se encuentre colocado de forma segura en la ranura.

5 Deslice la gradilla de reactivos para extraerla del compartimento de reactivos.

6 Coloque cada una de las botellas de reactivo en la gradilla, en la posición numerada correspondiente. Asegúrese de que el extremo cónico de la botella esté apoyado en la muesca de la base de la gradilla.

Tabla 5 Posiciones de los reactivos SBS

Posición	Reactivo	Descripción
1	ICB	Mezcla para incorporación
2	PW1 (25 ml)	Tampón de lavado
3	SRE	Reactivo de mezcla para lectura
4	Tampón de SBS 1 (SB1)	Tampón de alto contenido en sal
5	Tampón de SBS 2 (SB2)	Tampón de lavado de incorporación
6	Tampón de SBS 2 (SB2)	Tampón de lavado de incorporación
7	CMR	Reactivo de mezcla para clivaje
8	Tampón de SBS 3 (SB3)	Tampón de clivaje

7 Añada 25 ml de PW1 o agua de laboratorio a la botella de la posición 2.

8 Deslice la gradilla de reactivos dentro del compartimento de reactivos y alinee la gradilla con la guía elevada en el suelo del compartimento.

9 Baje los dispensadores e introdúzcalos en las botellas de reactivos de secuenciación como se indica a continuación:
a Tire del mango del dispensador hacia usted y, a continuación, bájelo.
b Inspeccione visualmente los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en las tapas de embudo.
c Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo inferior del canal.

10 Seleccione la casilla de verificación **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] cargada).

Carga de reactivos de indexación

1 Registre el peso de cada reactivo en el formulario de seguimiento del laboratorio.

2 Asegúrese de que la gradilla "paired-end" no se esté utilizando en la celda de flujo contigua. Los pasos que utilizan la gradilla "paired-end" incluyen la resíntesis de la Lectura 2, la preparación de la lectura del Índice 1 (i7) y la preparación de la lectura del Índice 2 (i5).

3 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos "paired-end" con el siguiente movimiento:
   a Tire del mango hacia usted y, a continuación, levántelo.
   b Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.

4 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.

5 Retire las tapas de todos los tubos de reactivos y coloque el tubo en la gradilla en la posición numerada asociada o el color de la etiqueta correspondiente.

Tabla 6 Experimento de un solo índice en una celda de flujo de lectura individual o celda de flujo "paired-end"

Posición	Reactivo	Descripción
17	HP8 o HP12	Mezcla para el cebador de secuenciación del Índice 1 (i7)
18	HP3	Solución de desnaturalización
19	HT2	Tampón de lavado

Tabla 7 Experimento de doble índice en una celda de flujo "single-read" (de lectura individual)

Posición	Reactivo	Descripción
16	HP9	Mezcla para el cebador de secuenciación del Índice 2 (i5) SR
17	HP8 o HP12	Mezcla para el cebador de secuenciación del Índice 1 (i7)
18	HP3	Solución de desnaturalización
19	HT2	Tampón de lavado

Tabla 8 Experimento de doble índice en una celda de flujo "paired-end"

Posición	Reactivo	Descripción
10	RMR	Mezcla para resíntesis

Posición	Reactivo	Descripción
17	HP8 o HP12	Mezcla para el cebador de secuenciación del Índice 1 (i7)
18	HP3	Solución de desnaturalización
19	HT2	Tampón de lavado

6 Coloque tubos cónicos de 15 ml con 10 ml de agua de laboratorio en posiciones de la gradilla que no se estén utilizando.

7 Deslice la gradilla de reactivos dentro del compartimento de reactivos y alinee la gradilla con la guía elevada en el suelo del compartimento.

8 Baje los dispensadores e introdúzcalos en los tubos de la gradilla de reactivos "paired-end" de la siguiente manera:
   a Tire del mango hacia usted y, a continuación, bájelo sin dejar de tirar.
   b Inspeccione visualmente los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en los tubos.
   c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.

9 Cierre la puerta del compartimento de reactivos.

10 Seleccione **Next** (Siguiente).

Cebado de reactivos

Entre los pasos para cebar reactivos se incluyen los siguientes: limpieza del soporte de la celda de flujo, carga de una celda de flujo para el cebado, confirmación de flujo correcto e inicio del cebado.

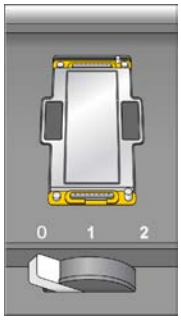
Limpieza del soporte de la celda de flujo

1 Abra la puerta del compartimento de la celda de flujo.

PRECAUCIÓN
No coloque líquidos sobre la puerta del compartimento de la celda de flujo o en la platina de la celda de flujo cuando la puerta esté abierta. Los derrames en esta zona pueden dañar el instrumento.

2 Compruebe que la palanca de la celda de flujo está en posición OFF (Desactivada).

Figura 23 Palanca de la celda de flujo en posición 0



3 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.

4 En caso de presencia de la celda de flujo de un experimento anterior, retírela y resérvela en un tubo de tampón de almacenamiento o agua de laboratorio para evitar que se seque. Se puede utilizar para confirmar un flujo adecuado antes de cargar la celda de flujo agrupada.

5 Con un paño humedecido en alcohol o una toallita sin pelusa humedecida en etanol o isopropanol, limpie con cuidado la superficie del soporte de la celda de flujo hasta que esté limpia.

PRECAUCIÓN
Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío ni alrededor de los distribuidores. Si es necesario, utilice una toallita de laboratorio sin pelusa para secar la platina.

6 Inspeccione visualmente el soporte de la celda de flujo para comprobar que no hay pelusas ni obstrucciones en los orificios de vacío.

Figura 24 Ubicaciones de los orificios de vacío

Carga de una celda de flujo para el cebado

En la pantalla Load Prime Flow Cell (Cargar celda de flujo para el cebado), cargue la celda de flujo ***usada*** para el cebado. Tras cargar la celda de flujo usada, compruebe que la función de vacío esté activada.

NOTA
Illumina recomienda utilizar la celda de flujo de un experimento anterior para el cebado de reactivos en un experimento posterior o para un lavado posterior a un experimento.

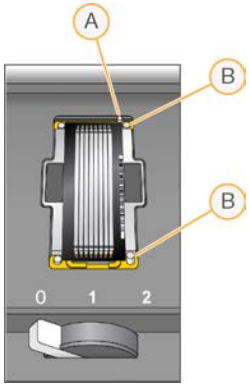
1. Enjuague la celda de flujo usada con agua de laboratorio. Seque la celda de flujo con una toallita para limpiar lentes o una toallita sin pelusa.
2. Limpie la celda de flujo con paños humedecidos en alcohol y una toallita para limpiar lentes.

NOTA
No extraiga ni sustituya las juntas de la celda de flujo durante este paso.

3. Coloque la celda de flujo usada en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia ***abajo*** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.
4. Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y derechos, hasta que se detenga.

NOTA
Retire las manos de la celda de flujo antes de accionar el interruptor de vacío para evitar posibles desvíos posteriores en la alineación.

Figura 25 Colocación de la celda de flujo contra los pasadores guía superiores y derechos



A Pasador guía superior
B Pasadores guía derechos

5 Mueva con cuidado la palanca de la celda de flujo a la posición 1, lo que activará el vacío y fijará la celda de flujo en su posición. Cuando la palanca de la celda de flujo parpadee emitiendo una luz verde, significa que el vacío está activado. Si la palanca no muestra luz verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos* en la página 149.

Figura 26 Palanca de la celda de flujo en posición 1

6 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2 (extremo derecho). Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo está lista para usarse.

Figura 27 Palanca de la celda de flujo en posición 2

7 Asegúrese de marcar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) en la pantalla de carga de la celda de flujo para el cebado y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

Confirmación de flujo correcto

Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y el distribuidor está acoplado.

1 Seleccione la solución 2 (agua de laboratorio) de la lista desplegable.

PRECAUCIÓN
Utilice agua para confirmar que el flujo es correcto solo en una celda de flujo usada. No use nunca agua para confirmar que el flujo es correcto en una celda de flujo agrupada.

2 Confirme los siguientes valores predeterminados:
- Volume (Volumen): **125**
- Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **250**
- Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**

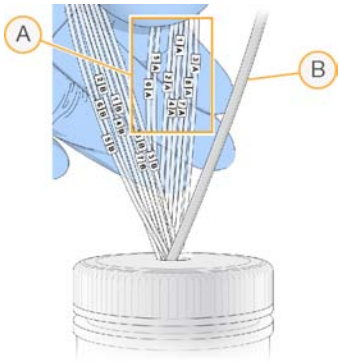
3 Seleccione **Pump** (Dispensar).

4 Inspeccione visualmente la celda de flujo para comprobar si hay burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.
Si detecta una presencia excesiva de burbujas, compruebe si las juntas están obstruidas, reduzca la velocidad de aspiración a 100 y bombee otros 125 µl de agua a la celda de flujo. Si el problema persiste, retire la celda de flujo, repita los pasos de limpieza y vuelva a cargarla.

Colocación de los tubos e inicio del cebado

1 Retire los ocho tubos de residuos de la celda de flujo apropiada del contenedor de residuos.
No incluya los ocho tubos de la celda de flujo opuesta ni el tubo de la bomba de condensación.

Figura 28 Colocación de los tubos



A Tubos de residuos de la celda de flujo para las posiciones de los reactivos 1–8
B Tubo de la bomba de condensación (no retirar)

2 Coloque los tubos de residuos en un tubo de 15 ml vacío, es decir, un tubo de residuos por cada tubo de 15 ml. El residuo de cebado se recoge y se mide después del paso de cebado.

3 Seleccione **Start Prime** (Iniciar cebado). Se abre la pantalla de cebado y se inicia el paso de cebado. Supervise el progreso del cebado en la pantalla de cebado.

4 Al finalizar el paso de cebado, mida el residuo obtenido y compruebe que el volumen en cada tubo sea de 1,75 ml para un total de **14 ml**. El total se calcula de la siguiente forma:
- 250 µl para cada posición SBS salvo la posición 2 (250 x 7 = 1,75 ml)
- 1,75 ml para cada carril (1,75 x 8 = 14 ml)

5 Registre los resultados en el formulario de seguimiento del laboratorio.

6 Antes de continuar, vuelva a colocar los tubos de residuos en el contenedor de residuos.

7 Seleccione **Next** (Siguiente).

Carga de una celda de flujo

Entre los pasos para cargar la celda de flujo agrupada se incluyen los siguientes: la extracción de la celda de flujo para el cebado, la limpieza del soporte de la celda de flujo, la limpieza de la celda de flujo, la carga de la celda de flujo y la confirmación del flujo correcto.

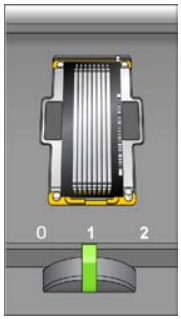
Consumibles proporcionados por el usuario

- Toallita para limpiar lentes
- Paños humedecidos en alcohol o etanol al 70 %
- Toallita de laboratorio sin pelusa
- Un par de pinzas hemostáticas de plástico

Retirada de la celda de flujo usada

1 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para desacoplar los distribuidores.

Figura 29 Palanca de la celda de flujo en posición 1



2 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 0 para desacoplar la junta de vacío y desbloquear la celda de flujo.

Figura 30 Palanca de la celda de flujo en posición 0

3 Levante la celda de flujo usada del soporte de la celda de flujo.

Limpieza del soporte de la celda de flujo

1 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.

2 Con un paño humedecido en alcohol o una toallita sin pelusa humedecida en etanol o isopropanol, limpie con cuidado la superficie del soporte de la celda de flujo hasta que esté limpia.

PRECAUCIÓN
Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío ni alrededor de los distribuidores. Si es necesario, utilice una toallita de laboratorio sin pelusa para secar la platina.

Figura 31 Inspección de los orificios de vacío

3 Inspeccione visualmente el soporte de la celda de flujo para comprobar que no hay pelusas ni obstrucciones en los orificios de vacío.

Limpieza de la celda de flujo

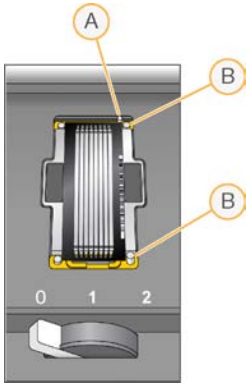
1. Extraiga la celda de flujo del contenedor de la celda de flujo con un par de pinzas hemostáticas de plástico.
2. Enjuague la celda de flujo con agua de laboratorio y séquela con una toallita para limpiar lentes.
3. Doble un paño humedecido en alcohol hasta que tenga el tamaño aproximado de la celda de flujo.
4. Sujete con dos dedos los extremos de la celda de flujo agrupada. Asegúrese de que los puertos de entrada y salida están boca ***arriba***.
5. Limpie cada lado de la celda de flujo con un solo movimiento de arrastre. Repita, doblando el paño después de cada pasada, hasta que la celda de flujo quede limpia.
6. Seque la celda de flujo con una toallita para limpiar lentes seca.
7. Proteja la celda de flujo del polvo hasta que vaya a cargarla en el instrumento.

Carga de la celda de flujo de secuenciación

NOTA
No sustituya las juntas del distribuidor. Sustituya las juntas del distribuidor cuando el experimento de secuenciación haya finalizado y antes del lavado de mantenimiento.

1. Coloque la celda de flujo en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia ***abajo*** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo señale al instrumento.
2. Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y derechos, hasta que se detenga.

Figura 32 Colocación de la celda de flujo contra los pasadores guía superiores y derechos



A Pasador guía superior
B Pasadores guía derechos

NOTA
Retire las manos de la celda de flujo antes de accionar el interruptor de vacío para evitar posibles desvíos posteriores en la alineación.

3 Mueva con cuidado la palanca de la celda de flujo a la posición 1, lo que activará el vacío y fijará la celda de flujo en su posición. Cuando la palanca de la celda de flujo parpadee emitiendo una luz verde, significa que el vacío está activado. Si la palanca no muestra luz verde, consulte *Posibles problemas de configuración de experimentos* en la página 149.

Figura 33 Palanca de la celda de flujo en posición 1

4 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2. Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo está lista para usarse.

Figura 34 Palanca de la celda de flujo en posición 2

5 Asegúrese de seleccionar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) en la pantalla Load Sequencing Flow Cell (Cargar celda de flujo de secuenciación).

Confirmación de flujo correcto

Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y el distribuidor está acoplado.

1 Seleccione la solución 5 en la lista desplegable.

2 Introduzca los siguientes valores predeterminados:
- Volume (Volumen): **250**
- Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **250**
- Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**

3 Seleccione **Pump** (Dispensar).

4 Inspeccione visualmente la celda de flujo para detectar burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.
Si detecta un exceso de burbujas, compruebe las juntas del distribuidor para detectar obstrucciones y repita el proceso con la solución 6 para evitar la eliminación de la posición 5. Reduzca la velocidad de aspiración a 100 y dispense otros 250 µl a la celda de flujo.

5 Seleccione **Next** (Siguiente). Asegúrese de que la palanca de la celda de flujo está de color verde y, a continuación, cierre la puerta del compartimento de la celda de flujo.

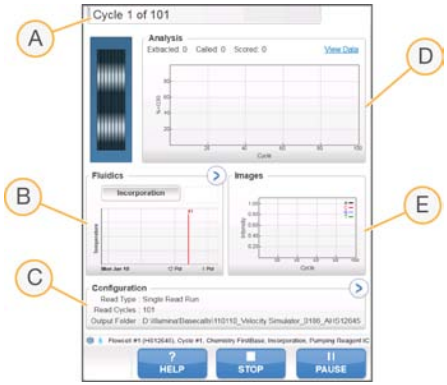
6 Confirme que las casillas de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y **Door Closed** (Puerta cerrada) están seleccionadas y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

7 Seleccione **Start** (Iniciar) para comenzar el experimento de secuenciación.

Monitorización del experimento

Supervise los criterios de medición del experimento que aparecen en la pantalla de resumen del experimento, la fluídica y la adquisición de imágenes.

Figura 35 Pantalla de resumen del experimento



- **A** **Barra de progreso:** Utilice la barra de progreso para supervisar el número de ciclos que han finalizado.
- **B** **Gráfico de fluídica:** Amplíe la sección de fluídica para supervisar los pasos de análisis químico.
- **C** **Configuración del experimento:** Consulte los parámetros del experimento actual.
- **D** **Gráfico de análisis:** Utilice el gráfico de análisis para supervisar las puntuaciones de calidad por ciclo.
- **E** **Gráfico de imágenes:** Utilice el gráfico de imágenes para supervisar las intensidades por ciclo.

Informe de primera base

Si ha seleccionado la opción **Confirm First Base** (Confirmar primera base) durante la configuración del experimento, se abrirá el cuadro de diálogo de confirmación de primera base automáticamente tras finalizar la adquisición de imágenes del primer ciclo. El experimento se pone en pausa en este paso.

1. Revise el informe de primera base del cuadro de diálogo de confirmación.
2. Si los resultados son satisfactorios, seleccione **Continue** (Continuar).

Procedimientos posteriores al experimento

Una vez finalizado el experimento, descargue y pese los reactivos y, a continuación, lave el instrumento. Si desea obtener más información, consulte *Procedimientos posteriores al experimento* en la página 115.

Preparación de reactivos para la Lectura 2

Antes de finalizar la Lectura 1 y cualquier lectura del índice, prepare los reactivos para la resíntesis de la Lectura 2 y el ICB nuevo para la Lectura 2.

Para obtener instrucciones sobre la preparación de reactivos, consulte la *TruSeq PE Cluster Kit v3 Reagent Prep Guide* (Guía de preparación de reactivos de TruSeq PE Cluster Kit v3), n.º de referencia 15023336. En esta guía se incluyen instrucciones para preparar los reactivos de secuenciación incluidos en la caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

NOTA

Para obtener un rendimiento óptimo, Illumina recomienda que prepare el ICB fresco (mezcla para incorporación) para la Lectura 2.

Carga de reactivos para la Lectura 2

Tras finalizar la Lectura 1 y cualquier lectura del índice, cargue los reactivos "paired-end" para la resíntesis de la Lectura 2 y un ICB recién preparado para la Lectura 2.

Carga de reactivos "paired-end"

1. Registre el peso de cada reactivo en el formulario de seguimiento del laboratorio.
2. Asegúrese de que la gradilla "paired-end" no se está utilizando en la celda de flujo opuesta para la resíntesis de la Lectura 2, la preparación de la lectura del índice 1 (i7) o la preparación de la lectura del índice 2 (i5).
3. Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos "paired-end" con el siguiente movimiento:
   a. Tire del mango hacia usted y levántelo.
   b. Suelte el mango en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango se encuentra colocado de forma segura en la ranura.
4. Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.
5. Retire las tapas de todos los tubos de reactivos.
6. Coloque cada uno de los tubos de reactivos en la gradilla en las posiciones numeradas asociadas.

Tabla 9 Posiciones de los reactivos "paired-end"

Posición	Reactivo	Descripción
10	RMR	Mezcla para resíntesis
11	LMX2	Mezcla para linealización 2
12	BMX	Mezcla para bloqueo
13	AMX2	Mezcla para amplificación 2
14	APM2	Premezcla AMX2
15	AT2	100 % formamida
16	HP7 o HP11	Cebador de secuenciación de la Lectura 2
18	HP3	Solución de desnaturalización
19	HT2	Tampón de lavado

NOTA
En el caso de los experimentos "paired-end" y de doble índice, RMR se carga con reactivos de indexación antes de comenzar el experimento. En el caso de los experimentos no indexados o de un solo índice, RMR se carga cuando se cargan los reactivos "paired-end".

7 Deslice la gradilla de reactivos dentro del compartimento de reactivos y alinee la gradilla con la guía elevada en el suelo del compartimento.

8 Baje los dispensadores e introdúzcalos en los tubos de reactivos "paired-end" del siguiente modo:
   a Tire del mango hacia usted y bájelo.
   b Inspeccione visualmente los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en los tubos.
   c Suelte el mango en la ranura del extremo inferior del canal.

Carga de ICB para la Lectura 2

1 Registre el peso del reactivo en el formulario de seguimiento del laboratorio.

2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos de secuenciación con el siguiente movimiento:
   a Tire del mango del dispensador hacia usted y levántelo.
   b Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango del dispensador se encuentre colocado de forma segura en la ranura.

3 Deslice la gradilla de reactivos para extraerla del compartimento de reactivos.

4 Retire la botella de reactivo ICB existente de la posición 1 de la gradilla de reactivos y retire la tapa de embudo de la botella.

5 Coloque la tapa de embudo en la botella de ICB nueva y cargue la botella en la posición 1. Asegúrese de que el extremo cónico de la botella esté apoyado en la muesca de la base de la gradilla.

6 Deslice la gradilla de reactivos dentro del compartimento de reactivos y alinee la gradilla con la guía elevada en el suelo del compartimento.

7 Baje los dispensadores e introdúzcalos en las botellas de reactivos de secuenciación como se indica a continuación:

a Tire del mango del dispensador hacia usted y bájelo.
b Inspeccione visualmente los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en las tapas de embudo.
c Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo inferior del canal.

8 Cierre la puerta del compartimento de reactivos y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente) para reanudar el experimento.

Capítulo 4

Realización de un experimento rápido

Introducción 84
Flujo de trabajo de la secuenciación de experimento rápido 86
Tipos de experimento para química de experimento rápido 87
Comprobación del volumen previa al experimento 89
Introducción de parámetros del experimento 90
Carga y cebado de reactivos 96
Carga de una celda de flujo 106
Monitorización del experimento 112

Introducción

El modo de experimento rápido proporciona dos opciones para el paso de la generación de grupos, en el cBot o en el HiSeq 2500. La generación de grupos en el cBot permite dos bibliotecas, una por cada carril, en la celda de flujo rápida de dos carriles. Tras la hibridación de la plantilla y la primera extensión en el cBot, el resto del proceso de la generación de grupos se lleva a cabo en el HiSeq.

Tras la preparación de los reactivos, entre los pasos de configuración del experimento se incluyen la introducción de los parámetros del experimento, la carga y el cebado de los reactivos, la carga de la celda de flujo, y la realización de una comprobación de fluídica. Si la generación de grupos se realiza en HiSeq 2500, se omite el paso de cebado de reactivos en los pasos de configuración del experimento.

Visite la página de especificaciones de HiSeq 2500 en el sitio web de Illumina para obtener más información acerca de la duración y otras especificaciones de rendimiento.

Consumibles para secuenciación del experimento rápido

Nombre del kit de experimento rápido	Descripción
HiSeq Rapid SBS Kit v2 o TruSeq Rapid SBS Kit (v1)	Contiene reactivos SBS que se utilizan en el HiSeq 2500 y tapones de embudo para las botellas de reactivos SBS.
HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2 o HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2 o TruSeq Rapid PE Cluster Kit (v1) o TruSeq Rapid SR Cluster Kit (v1)	Contiene reactivos de agrupación e indexación utilizados en el HiSeq 2500 y un juego de juntas de celda de flujo. Las versiones PE de los kits de generación de grupos incluyen reactivos "paired-end" que se utilizan en el HiSeq 2500.

Pasos de preparación de los reactivos

Antes de configurar el experimento, prepare los reactivos SBS, los reactivos de indexación y los reactivos "paired-end".

- Para la preparación de reactivos SBS, consulte la guía correspondiente:
  - *HiSeq Rapid SBS Kit v2 Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de HiSeq Rapid SBS Kit v2), n.º de referencia 15058772*
  - *TruSeq Rapid SBS Kit Reagent Prep Guide (200 Cycles) (Guía de preparación de reactivos de TruSeq Rapid SBS Kit [200 ciclos]), n.º de referencia 15036501*
  - *TruSeq Rapid SBS Kit Reagent Prep Guide (50 Cycles) (Guía de preparación de reactivos de TruSeq Rapid SBS Kit [50 ciclos]), n.º de referencia 15036502*
- Para la preparación de reactivos "paired-end" y de indexación, consulte la guía correspondiente:
  - *HiSeq Rapid Cluster Kit v2 Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de HiSeq Rapid Cluster Kit v2), n.º de referencia 15059131*
  - *TruSeq Rapid PE Cluster Kit Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de TruSeq Rapid PE Cluster Kit), n.º de referencia 15038861*
  - *TruSeq Rapid SR Cluster Kit Reagent Prep Guide (Guía de preparación de reactivos de TruSeq Rapid SR Cluster Kit), n.º de referencia 15038860*

Antes de configurar el experimento, prepare todos los reactivos. Cuando se lo solicite el software de control, cargue todos los reactivos. Si utiliza la química de experimento rápido, no tendrá que volver al instrumento durante el experimento para cargar los reactivos.

Flujo de trabajo de la secuenciación de experimento rápido

Prepare todos los reactivos para el experimento y la cadena molde de la biblioteca.

Para obtener información sobre la preparación de los reactivos, consulte *Pasos de preparación de los reactivos* en la página 85.

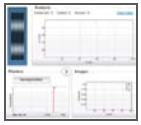
Con el software de control, realice una comprobación del volumen e introduzca los parámetros del experimento.

Para la generación de grupos integrada en el instrumento: Cargue todos los reactivos del experimento y la cadena molde de la biblioteca preparada.

Para la generación de grupos en el cBot: Cargue todos los reactivos del experimento.

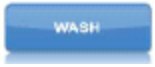
Con una celda de flujo usada en el instrumento, confirme el flujo correcto.

Para la generación de grupos en el cBot: Cebe los reactivos SBS y mida los residuos del cebado.



Inicie el experimento de secuenciación. Después del ciclo 1, inspeccione el informe de primera base (ajuste opcional) y, a continuación, continúe con la Lectura 1.

El experimento de secuenciación continúa a través del análisis PE y la Lectura 2 sin necesidad de intervención.



Una vez finalizado el experimento, descargue y pese los reactivos. Lleve a cabo un lavado con agua posterior al experimento.

Tipos de experimento para química de experimento rápido

En las siguientes tablas se muestran los tipos de experimentos de secuenciación y el número de ciclos posibles para cada lectura cuando se utiliza la química de experimento rápido. Utilice esta información a modo de referencia a la hora de configurar el experimento.

Tabla 10 HiSeq Rapid SBS Kit v2

Tipo de experimento	Ciclos de Lectura 1	Ciclos de lectura de Índice 1 (i7)	Ciclos de lectura de Índice 2 (i5)	Ciclos de Lectura 2	Ciclos totales
Lectura individual, no indexada	≤ 251	--	--	--	≤ 251
Lectura individual, un solo índice	≤ 251	7 [1] 8 [2]	--	--	≤ 258 [1] ≤ 259 [2]
Lectura individual, doble índice	≤ 251	8	8	--	≤ 267
"Paired-end", no indexada	≤ 251	--	--	≤ 251	≤ 502
"Paired-end", un solo índice	≤ 251	7 [1] 8 [2]	--	≤ 251	≤ 509 [1] ≤ 510 [2]
"Paired-end", doble índice	≤ 251	8	7 + 8 [3]	≤ 251	≤ 525

Tabla 11 TruSeq Rapid SBS Kit (v1)

Tipo de experimento	Ciclos de Lectura 1	Ciclos de lectura de Índice 1 (i7)	Ciclos de lectura de Índice 2 (i5)	Ciclos de Lectura 2	Ciclos totales
Lectura individual, no indexada	≤ 101	--	--	--	≤ 101
Lectura individual, un solo índice	≤ 101	7 [1] 8 [2]	--	--	≤ 108 [1] ≤ 109 [2]
Lectura individual, doble índice	≤ 101	8	8	--	≤ 117

Tipo de experimento	Ciclos de Lectura 1	Ciclos de lectura de Índice 1 (i7)	Ciclos de lectura de Índice 2 (i5)	Ciclos de Lectura 2	Ciclos totales
"Paired-end", no indexada	≤ 101	--	--	≤ 101	≤ 202
"Paired-end", un solo índice	≤ 101	7 [1] 8 [2]	--	≤ 101	≤ 209 [1] ≤ 210 [2]
"Paired-end", doble índice	≤ 101	8	7 + 8 [3]	≤ 101	≤ 225

[1] Número de ciclos para bibliotecas de un solo índice.
[2] Número de ciclos para bibliotecas de doble índice.
[3] La lectura de índice 2 de un experimento de doble índice "paired-end" incluye siete ciclos de solo química adicionales.

Comprobación del volumen previa al experimento

En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Sequence** | **New Run** (Secuenciar | Nuevo experimento). Se abre la pantalla Volume Check (Comprobación del volumen).

Pantalla de comprobación del volumen

1. Cuando el software le solicite realizar una comprobación del volumen, seleccione **Yes** (Sí).
2. Coloque los tubos de residuos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 de la celda de flujo actual en una botella de 1 litro llena de agua desionizada. La colocación de los tubos en agua desionizada impide que las bombas de los reactivos se dañen.
3. Cargue agua de laboratorio en las ocho posiciones SBS, las diez posiciones de la gradilla "paired-end" y la posición de la biblioteca para la celda de flujo actual.
4. Cierre la estación de carga.
5. Seleccione la casilla de verificación **Water loaded and template loading station closed** (Agua cargada y estación de carga de cadenas molde cerrada).
6. Seleccione **Next** (Siguiente).
7. Asegúrese de que haya una celda de flujo rápida utilizada cargada en el instrumento. Introduzca el ID de la celda de flujo utilizada.
8. Seleccione **Next** (Siguiente).
9. Seleccione **Pump** (Dispensar) para confirmar el flujo.
10. Coloque los tubos 4 y 5 en tubos cónicos de 15 ml vacíos individuales.
11. Seleccione **Next** (Siguiente). Se iniciará la comprobación del volumen.
    Cuando la comprobación del volumen haya finalizado, el volumen esperado será de 9,5 ml ±10 % para cada tubo.
12. Devuelva todos los tubos a la botella de residuos.
13. Seleccione **Next** (Siguiente).

Introducción de parámetros del experimento

En la pantalla de bienvenida, seleccione **Sequence** | **New Run** (Secuenciar | Nuevo experimento).

La interfaz del software de control le guía por los pasos de configuración del experimento. Los pasos de configuración del experimento se organizan en tres pestañas: Run Configuration (Configuración del experimento), Pre-Run Setup (Configuración previa al experimento) e Initiate Run (Iniciar experimento).

- Las pantallas de configuración del experimento contienen listas desplegables, casillas de verificación o campos de texto para los parámetros del experimento. Utilice el lector de códigos de barras portátil para leer el ID del kit de reactivos o de la celda de flujo, o introduzca el ID con ayuda del teclado táctil. El icono de teclado se encuentra a la derecha de los campos de texto.
- Seleccione **Next** (Siguiente) para pasar a la siguiente pantalla o seleccione **Back** (Atrás) para volver a la pantalla anterior.
- En cualquier momento durante los pasos de configuración del experimento, puede seleccionar **Cancel** (Cancelar) para abandonar la configuración del experimento y volver a la pantalla Welcome (Bienvenida).

Pantalla de integración

La pantalla de integración permite conectar el experimento a BaseSpace.

Para conectarlo a BaseSpace, realice lo siguiente:

1. Seleccione **BaseSpace**.
2. Seleccione una de las siguientes opciones de BaseSpace:
   - **Storage and Analysis** (Almacenamiento y análisis): Envía los datos del experimento a BaseSpace para la supervisión remota y el análisis de los datos. Con esta opción, se precisa una hoja de muestras.
   - **Run Monitoring Only** (Solo supervisión del experimento): Envía solamente los archivos InterOp a BaseSpace, lo que le permite supervisar el experimento de forma remota.
3. Inicie sesión en BaseSpace con su correo electrónico y la contraseña de la cuenta de MyIllumina.
4. Seleccione **Next** (Siguiente).

Para continuar sin conexión a BaseSpace, realice lo siguiente:

1 Seleccione **None** (Ninguno).

2 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de almacenamiento

1 Seleccione la casilla de verificación **Save to an output folder** (Guardar en una carpeta de salida) y seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación de red deseada. Si el experimento está conectado a BaseSpace para almacenamiento y análisis, este campo es opcional.

2 Seleccione **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) para reducir el espacio de almacenamiento necesario. Si el experimento está conectado a BaseSpace, la opción **Zip BCL files** (Comprimir archivos BCL) está seleccionada de forma predeterminada.

NOTA
El parámetro **Bin Q-Scores** (Agrupar puntuaciones Q) está activado de forma predeterminada para reducir el espacio de almacenamiento necesario. Este parámetro agrupa las puntuaciones de calidad de un rango de valores más amplio sin repercutir en la precisión ni el rendimiento.

3 Seleccione una de las siguientes opciones de Save Auxiliary Files (Guardar archivos auxiliares):

- **Save All Thumbnails** (Guardar todas las vistas en miniatura): Guarda todas las imágenes en miniatura. Una imagen en miniatura es una muestra de imágenes de muchas placas en cada columna de placas, o sector, combinada en una imagen en miniatura.
- **Save Tile Thumbnails** (Guardar vistas en miniatura de placa): Guarda las vistas en miniatura de las placas. Las vistas en miniatura de las placas representan una única placa en lugar de una muestra de placas en un sector.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración de la celda de flujo

La pantalla Flow Cell Setup (Configuración de la celda de flujo) registra información acerca de la celda de flujo utilizada en el experimento.

1 Seleccione un tipo de kit de reactivos, **TruSeq Rapid v1** o **HiSeq Rapid v2**.

2 Realice la lectura del código de barras de la celda de flujo o introduzca el ID (número del código de barras) de la celda de flujo que desea secuenciar. El ID de la celda de flujo se utiliza para determinar el tipo de celda de flujo y la compatibilidad de los reactivos.

3 Confirme que el tipo de celda de flujo sea correcto, ya sea la **celda de flujo TruSeq Rapid v1** o la **celda de flujo HiSeq Rapid v2**. El tipo de celda de flujo se selecciona de forma automática en función del ID de la celda de flujo.

4 Introduzca un nombre para el experimento. El nombre del experimento aparece en cada pantalla para ayudar a identificar el experimento en curso.

5 Introduzca un nombre de usuario.

6 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de configuración avanzada

1 [Opcional] Seleccione la casilla de verificación **Confirm First Base** (Confirmar primera base).
Se genera un informe de primera base automáticamente para cada experimento. Al seleccionar esta opción se abre el informe de primera base antes de continuar con el experimento.

2 [Opcional] En las casillas de verificación de **Align to PhiX** (Alinear a PhiX), anule la selección de la casilla de verificación de los carriles que no contienen PhiX.
De forma predeterminada, se seleccionan todos los carriles para la alineación mediante el análisis en tiempo real.
También puede optar por seleccionar los carriles de la imagen de la celda de flujo para añadir o eliminar carriles para la alineación de PhiX.

NOTA
No se requiere ningún carril de control específico con HCS v2.2 ni RTA v1.18. Por lo tanto, la opción para asignar un carril de control no está disponible con esta configuración de software.

3 [Opcional][Para TruSeq Rapid v1] Seleccione **Keep Intensity Files** (Conservar archivos de intensidad) para volver a realizar análisis con posterioridad o personalizar el procesamiento.

De forma predeterminada, esta opción no está seleccionada. No es necesario guardar archivos de intensidad para el análisis integrado en el instrumento. Si activa esta opción, aumenta de forma considerable el tamaño de la carpeta de salida de datos.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de fórmulas

En la pantalla Recipe (Fórmula) se genera automáticamente una fórmula a partir de la información introducida.

1 Seleccione de las siguientes opciones de Index Type (Tipo de índice):
- **No Index** (No indexado): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) no indexado.
- **Single Index** (Un solo índice): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) con una lectura de indexación.
- **Dual Index** (Doble índice): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) con dos lecturas de indexación.
- **Custom** (Personalizado): Realiza un experimento "paired-end" o "single-read" (de lectura individual) con un número de ciclos personalizado de lecturas del índice.

2 Si especifica la opción Dual Index (Doble índice) o Custom (Personalizado), seleccione un formato de celda de flujo: bien **Single Read** (Lectura única) o bien **Paired End**.

3 Introduzca el número de ciclos para la Lectura 1 y la Lectura 2, según sea necesario.

NOTA
El número de ciclos realizados en una lectura es de un ciclo más que el número de ciclos analizados. Por ejemplo, para realizar 100 ciclos para la Lectura 1, introduzca 101.

Para la opción de indexación **Custom** (Personalizado), introduzca el número de ciclos para las lecturas del índice. Las longitudes de lectura no tienen por qué ser idénticas.

4 Confirme los siguientes parámetros de análisis químico: Estos campos se completan automáticamente en función del tipo de kit de reactivos y del formato de celda de flujo que se haya seleccionado.
a **SBS**: **TruSeq Rapid SBS Kit v1** o **HiSeq Rapid SBS Kit v2**
b **Cluster Kit** (Kit de generación de grupos): **TruSeq Rapid PE Cluster Kit v1**, **TruSeq Rapid SR Cluster Kit v1**, **HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2** o **HiSeq Rapid SR Cluster Kit v2**

5 [Opcional] Seleccione la casilla de verificación **Use Existing Recipe** (Usar fórmula existente) para utilizar una fórmula personalizada. También puede dejar que el software cree la fórmula a partir de los parámetros del experimento introducidos.

Pantalla de hoja de muestras

Las hojas de muestras son opcionales salvo si utiliza BaseSpace para realizar análisis de datos, ejecutar un experimento de indexación o prevé supervisar el rendimiento de la demultiplexación con el visor del análisis de secuenciación. Para obtener información adicional, consulte la *Guía del usuario del Visor del análisis de secuenciación (SAV), n.º de referencia 15020619*.

1 Seleccione una de las siguientes opciones para especificar el método de generación de grupos:
   - Seleccione **On-Board Cluster Generation** (Generación de grupos incorporada) para llevar a cabo la generación de grupos integrada en el instrumento.
   - Si se ha iniciado la generación de grupos en el cBot, seleccione **Template Hybridization on cBot** (Hibridación de la cadena molde en cBot).

2 Seleccione **Next** (Siguiente).

3 En el campo Sample Sheet (Hoja de muestras), seleccione **Browse** (Examinar) y vaya a la ubicación de la hoja de muestras.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de reactivos

La pantalla Reagents (Reactivos) registra información sobre los kits de reactivos utilizados para el experimento. El ID del kit de reactivos (el número de código de barras comienza por **RGT**) se utiliza para determinar el tipo del kit de reactivos y la compatibilidad con los modos de experimento.

1 Realice una lectura o introduzca el ID del kit de reactivos SBS.

2 En el caso de los experimentos "paired-end", lea o introduzca el ID del kit de reactivos del kit de generación de grupos.

3 Seleccione el kit de reactivos SBS para el experimento:

- [Para HiSeq Rapid SBS Kit v2] Seleccione **500 Cycles** (500 ciclos) para un kit de 500 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 525 ciclos de forma predeterminada.
- Seleccione **200 Cycles** (200 ciclos) para un kit de 200 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 225 de forma predeterminada.
- Seleccione **50 Cycles** (50 ciclos) para un kit de 50 ciclos. Los ciclos restantes se establecen en 74 de forma predeterminada.
- Seleccione **Custom** (Personalizar) para un kit parcial o varios kits de 50 ciclos. En el campo Cycles Remaining (Ciclos restantes), introduzca el número de ciclos SBS que se espera que duren los reactivos.

NOTA
En el caso de los kits parciales, el software cuenta el número de ciclos introducidos. Cuando los ciclos están en un nivel bajo, el software le solicita cargar reactivos nuevos.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Pantalla de revisión

1 Revise los parámetros del experimento en la pantalla Review (Revisión).

2 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar o seleccione **Back** (Atrás) para modificar los parámetros.

Carga y cebado de reactivos

Tras introducir los parámetros del experimento, cargue los reactivos SBS, "paired-end", de agrupación y de indexación para el experimento. A continuación, cebe los reactivos con el sistema de fluídica. El software le guiará a través de estos pasos mediante una serie de pantallas en la pestaña Pre-Run Setup (Configuración previa al experimento).

Consumibles proporcionados por Illumina

- Ocho tapas de embudo

Consumibles proporcionados por el usuario

- Botella de 250 ml (Corning, n.º de catálogo 430776)
- Tubos cónicos de 15 ml (Corning, n.º de catálogo 430052)
- Agua de laboratorio

NOTA

Para preparar el enjuague posterior al experimento al final del experimento de secuenciación, cargue 25 ml de PW1 o agua de laboratorio en la posición 2.

El enjuague posterior al experimento ***no*** sustituye al lavado del instrumento posterior al experimento.

Carga de reactivos de agrupación y SBS

Asegúrese de que los reactivos SBS estén listos para cargarlos en el instrumento.

Consumibles proporcionados por Illumina

- Ocho tapas de embudo

Consumibles proporcionados por el usuario

- Una botella de 250 ml (Corning, n.º de catálogo 430776)
- Un tubo Eppendorf abatible por celda de flujo (1,5 ml o 1,7 ml). No utilice tubos con tapas roscadas.

Procedimiento

1 Registre el peso de cada reactivo en el formulario de seguimiento del laboratorio.

2 Abra la puerta del compartimento de reactivos.

3 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos de secuenciación con el siguiente movimiento:
   a Tire del mango hacia usted y, a continuación, levántelo.
   b Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango del dispensador se encuentre colocado de forma segura en la ranura.

4 Deslice la gradilla de reactivos SBS para extraerla del compartimento de reactivos.

5 Retire la tapa de cada botella de reactivo y sustitúyala por una tapa de embudo. Sustituya la tapa de la botella de CRM en último lugar y, a continuación, cambie los guantes.

6 Coloque cada una de las botellas de reactivos SBS en la gradilla, en la posición numerada correspondiente. Asegúrese de que el extremo cónico de la botella esté apoyado en la muesca de la base de la gradilla.

Tabla 12 Posiciones de reactivos SBS de HiSeq Rapid v2

Posición	Reactivo	Descripción
1	IMT	Mezcla maestra para incorporación
2	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio
3	USM	Mezcla de lectura universal
4	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio
5	USB	Tampón de secuenciación universal
6	USB	Tampón de secuenciación universal
7	CRM	Reactivo de mezcla maestra para clivaje
8	CWM	Mezcla de lavado para clivaje

Tabla 13 Posiciones de reactivos SBS de TruSeq Rapid (v1)

Posición	Reactivo	Descripción
1	IMM	Mezcla maestra para incorporación
2	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio
3	SRM	Reactivo de mezcla maestra para lectura
4	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio
5	USB	Tampón de secuenciación universal
6	USB	Tampón de secuenciación universal
7	CRM	Reactivo de mezcla maestra para clivaje
8	PW1	25 ml de PW1 o agua de laboratorio

7 Cargue 25 ml de PW1 o de agua de laboratorio en las siguientes posiciones:
- [Para HiSeq Rapid SBS Kit v2] Posiciones 2 y 4.
- [Para TruSeq Rapid SBS Kit] Posiciones 2, 4 y 8.

8 Deslice la gradilla SBS hacia dentro del compartimento de reactivos y alinéela con la guía elevada del suelo del compartimento.

9 Seleccione la casilla de verificación **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] cargada).

10 Deslice la gradilla de reactivos PE para extraerla del compartimento de reactivos.

11 Retire las tapas de los tubos de reactivos y colóquelos en la gradilla en la posición numerada correspondiente.

Tabla 14 Celda de flujo "single-read" (de lectura individual)

Posición	Reactivo	Descripción
10	PW1	10 ml de PW1 o agua de laboratorio
11	PW1	10 ml de PW1 o agua de laboratorio
12	PW1	10 ml de PW1 o agua de laboratorio
13	AMS	Mezcla para amplificación rápida
14	FPM	Premezcla rápida
15	FDR	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
16	HP9*	Cebador de Índice i5
17	HP12*	Cebador de Índice i7
18	HP10	Cebador de Lectura 1
19	FLS	Solución de linealización rápida

* Se requiere HP9 solamente para experimentos de doble índice. Se requiere HP12 para todas las opciones de indexación. Si no se utilizan HP9 ni HP12, cargue un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de PW1 o agua de laboratorio en la posición 16 para HP9 y en la posición 17 para HP12.

Tabla 15 Celda de flujo "paired-end"

Posición	Reactivo	Descripción
10	FRM	Mezcla para resíntesis rápida
11	FLM2	Mezcla para linealización rápida 2 (Lectura 2)
12	FLM1	Mezcla para linealización rápida 1 (Lectura 1)
13	AMS	Mezcla para amplificación rápida
14	FPM	Premezcla rápida

Posición	Reactivo	Descripción
15	FDR	Reactivo de desnaturalización rápida (contiene formamida)
16	HP11	Cebador de Lectura 2
17	HP12*	Cebador de Índice i7
18	HP10	Cebador de Lectura 1
19	PW1	10 ml de PW1 o agua de laboratorio

* HP12 solo es necesario para experimentos indexados. Si no se utiliza HP12, cargue un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de PW1 o agua de laboratorio en la posición 17.

12 Añada 10 ml de PW1 o agua de laboratorio a tubos cónicos de 15 ml en las siguientes posiciones:
- Experimento "paired-end": posición 19
  No indexado: posición 17
- Experimento de lectura individual: posiciones 10, 11 y 12
  No indexado: posiciones 16 y 17

13 Deslice la gradilla PE hacia dentro del compartimento de reactivos y alinee las gradillas con la guía elevada del suelo del compartimento.

14 Baje los dispensadores e introdúzcalos en las botellas de reactivos de secuenciación como se indica a continuación:
a Tire del mango del dispensador hacia usted y, a continuación, bájelo.
b Inspeccione visualmente los dispensadores para asegurarse de que no se doblan cuando se bajan para introducirlos en las tapas de embudo.
c Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo inferior del canal.

Carga de cadenas molde

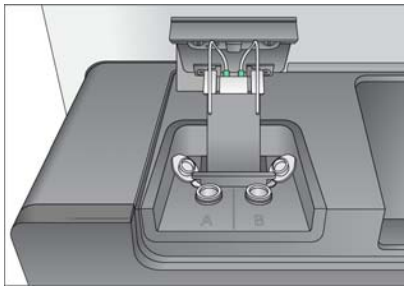
Cargue la cadena molde de la biblioteca para la generación de grupos en el instrumento. Para obtener las instrucciones de preparación de bibliotecas, consulte *Desnaturalización y dilución de bibliotecas para HiSeq y GAIIx (n.º de referencia 15050107)*.

NOTA
Si se ha utilizado el cBot para la generación de grupos, coloque dos tubos Eppendorf con 1 ml de agua desionizada en la estación de carga en lugar de utilizar las siguientes instrucciones.

1 Añada la cadena molde de la biblioteca preparada de 420 µl en un tubo Eppendorf de 1,5 ml o 1,7 ml.

2 Cargue la cadena molde en la estación de carga tal y como se indica a continuación:
   a Abra la puerta de la estación de carga.
   b Extraiga el tubo Eppendorf que contiene agua y sustitúyalo por el tubo Eppendorf que contiene 420 µl de cadena molde de la biblioteca preparada.
   c Asegure las tapas por debajo de la barra de detrás de los tubos para evitar interferencias con los dispensadores.

Figura 36 Estación de carga



NOTA
El líquido que queda en el tubo tras el experimento está muy diluido y no se puede volver a utilizar.

   d Cierre con cuidado la puerta de la estación de carga y asegúrese de que los dispensadores estén correctamente alineados con los tubos Eppendorf cuando la tapa esté cerrada.

3 Seleccione la casilla de verificación **Template loaded and template loading station closed** (Cadena molde cargada y estación de carga de cadenas molde cerrada).

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Cebado de reactivos

NOTA
Cebe los reactivos únicamente si ha utilizado HiSeq o TruSeq Rapid Duo Sample Loading Kit para realizar la hibridación de la cadena molde en el instrumento cBot. De lo contrario, omita el paso de cebado de reactivos y continúe con *Carga de una celda de flujo* en la página 106.

Entre los pasos para cebar reactivos se incluyen la limpieza del soporte de la celda de flujo, la carga de una celda de flujo usada, la confirmación de flujo correcto y el inicio del cebado.

Limpieza del soporte de la celda de flujo

1 Abra la puerta del compartimento de la celda de flujo.

PRECAUCIÓN
No coloque líquidos sobre la puerta del compartimento de la celda de flujo o en la platina de la celda de flujo cuando la puerta esté abierta. Los derrames en esta zona pueden dañar el instrumento.

2 Compruebe que la palanca de la celda de flujo está en posición OFF (Desactivada).

Figura 37 Palanca de la celda de flujo en posición 0

3 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.

4 En caso de presencia de la celda de flujo de un experimento anterior, retírela y resérvela en un tubo de tampón de almacenamiento o agua de laboratorio para evitar que se seque. Se puede utilizar para confirmar un flujo adecuado antes de cargar la celda de flujo agrupada.

5 Con un paño humedecido en alcohol o una toallita sin pelusa humedecida en etanol o isopropanol, limpie con cuidado la superficie del soporte de la celda de flujo hasta que esté limpia.

PRECAUCIÓN
Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío ni alrededor de los distribuidores. Si es necesario, utilice una toallita de laboratorio sin pelusa para secar la platina.

6 Inspeccione visualmente el soporte de la celda de flujo para comprobar que no hay pelusas ni obstrucciones en los orificios de vacío.

Figura 38 Ubicaciones de los orificios de vacío

Carga de una celda de flujo para el cebado

NOTA
Utilice la celda de flujo usada para cebar los reactivos. No utilice la celda de flujo que desee secuenciar.

1 Lave una celda de flujo usada con agua de laboratorio. Séquela con una toallita para limpiar lentes o una toallita sin pelusa.

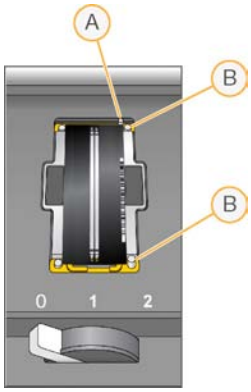
2 Limpie la celda de flujo con paños humedecidos en alcohol y una toallita para limpiar lentes.

NOTA
No extraiga ni sustituya las juntas del distribuidor.

3 Coloque la celda de flujo usada en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia ***abajo*** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.

4 Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y derechos, hasta que se detenga.

Figura 39 Colocación de la celda de flujo contra los pasadores guía superiores y derechos



A Pasador guía superior
B Pasadores guía derechos

NOTA
Retire las manos de la celda de flujo antes de accionar el interruptor de vacío para evitar posibles desvíos posteriores en la alineación.

5 Mueva con cuidado la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para activar el vacío y fijar la celda de flujo en su posición. Cuando la palanca de la celda de flujo está verde, el vacío está activado.

Figura 40 Palanca de la celda de flujo en posición 1

6 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2 (extremo derecho). Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo está lista para usarse.

Figura 41 Palanca de la celda de flujo en posición 2

7 Introduzca el ID de la celda de flujo.

NOTA
Puede utilizar una celda de flujo TruSeq Rapid o HiSeq Rapid v2 para el cebado.

8 Asegúrese de marcar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) en la pantalla de carga de la celda de flujo para el cebado y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

Confirmación de flujo correcto

Después de cargar la celda de flujo usada, compruebe que el flujo es correcto. Un flujo correcto confirma que la celda de flujo y las juntas están bien instaladas y el distribuidor está acoplado.

1 Seleccione la solución 2 (agua de laboratorio) de la lista desplegable.

PRECAUCIÓN
Utilice agua para confirmar que el flujo es correcto solo en una celda de flujo usada. No use nunca agua para confirmar que el flujo es correcto en una celda de flujo agrupada.

2 Confirme los siguientes valores predeterminados:
- Volume (Volumen): **250**
- Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **1500**
- Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**

3 Seleccione **Pump** (Dispensar).

4 Inspeccione visualmente la celda de flujo para comprobar si hay burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.

Si detecta una presencia excesiva de burbujas, compruebe si las juntas están obstruidas, reduzca la velocidad de aspiración a 1000 y bombee otros 250 µl de agua a la celda de flujo. Si el problema persiste, retire la celda de flujo, repita los pasos de limpieza y vuelva a cargarla.

Colocación de tubos y cebado de reactivos

1. Afloje los tubos de residuos de la celda de flujo apropiada y retírelos del contenedor de residuos. No incluya los ocho tubos de la celda de flujo opuesta ni el tubo de la bomba de condensación.
2. Coloque los tubos 4 y 5 en tubos de 15 ml diferentes.
3. Coloque los tubos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 en una botella que contenga agua de laboratorio.
4. Seleccione **Next** (Siguiente).
5. Seleccione **Start Prime** (Iniciar cebado) para comenzar el cebado. Puede supervisar el progreso del cebado en la pantalla de cebado.
6. Cuando termine, mida el residuo de cebado obtenido y compruebe que el volumen sea de 2,5 ml ±10 %, 500 µl por reactivo y carril. Registre los resultados en el formulario de seguimiento del laboratorio.
7. Vuelva a colocar los tubos 4 y 5 en el contenedor de residuos antes de continuar. Deje los tubos de residuos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 en la botella que contiene agua de laboratorio.
8. Seleccione **Next** (Siguiente).

Carga de una celda de flujo

El siguiente paso es retirar la celda de flujo usada y cargar la celda de flujo que desea para la secuenciación.

NOTA
Si se ha utilizado el cBot para la generación de grupos, cargue la celda de flujo agrupada. Para la generación de grupos integrada en el instrumento, cargue una nueva celda de flujo.

Retirada de la celda de flujo usada

1 Abra la puerta del compartimento de la celda de flujo.

Figura 42 Palanca de la celda de flujo en posición 1

2 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para desacoplar los distribuidores.

3 Mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 0 para desacoplar la junta de vacío y desbloquear la celda de flujo.

Figura 43 Palanca de la celda de flujo en posición 0

4 Levante la celda de flujo usada del soporte de la celda de flujo.

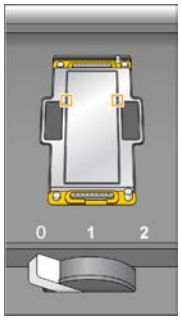
Limpieza del soporte de la celda de flujo

1 Utilice un nuevo par de guantes de látex sin polvo.

2 Con un paño humedecido en alcohol o una toallita sin pelusa humedecida en etanol o isopropanol, limpie con cuidado la superficie del soporte de la celda de flujo hasta que esté limpia.

PRECAUCIÓN
Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío ni alrededor de los distribuidores. Si es necesario, utilice una toallita de laboratorio sin pelusa para secar la platina.

Figura 44 Inspección de los orificios de vacío



3 Inspeccione visualmente el soporte de la celda de flujo para comprobar que no hay pelusas ni obstrucciones en los orificios de vacío.

Limpieza de la celda de flujo

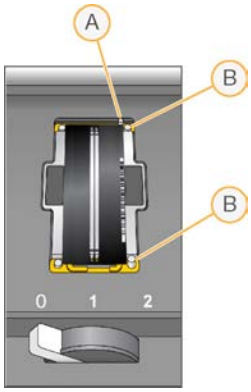
1. Extraiga la celda de flujo del contenedor de la celda de flujo con un par de pinzas hemostáticas de plástico.
2. Enjuague la celda de flujo con agua de laboratorio y séquela con una toallita para limpiar lentes.
3. Doble un paño humedecido en alcohol hasta que tenga el tamaño aproximado de la celda de flujo.
4. Sujete con dos dedos los extremos de la celda de flujo agrupada. Asegúrese de que los puertos de entrada y salida están boca ***arriba***.
5. Limpie cada lado de la celda de flujo con un solo movimiento de arrastre. Repita, doblando el paño después de cada pasada, hasta que la celda de flujo quede limpia.
6. Seque la celda de flujo con una toallita para limpiar lentes seca.
7. Proteja la celda de flujo del polvo hasta que vaya a cargarla en el instrumento.

Carga de la celda de flujo de secuenciación

NOTA
No sustituya las juntas del distribuidor. Sustituya las juntas del distribuidor cuando el experimento de secuenciación haya finalizado y antes del lavado de mantenimiento.

1. Coloque la celda de flujo en el soporte de la celda de flujo con los puertos de entrada y salida hacia ***abajo*** y el código de barras en el lado derecho. Asegúrese de que la flecha del extremo izquierdo de la celda de flujo, que indica la dirección del flujo, apunta hacia el instrumento.
2. Deslice suavemente la celda de flujo hacia los pasadores guía superiores y derechos, hasta que se detenga.

Figura 45 Colocación de la celda de flujo contra los pasadores guía superiores y derechos



A Pasador guía superior
B Pasadores guía derechos

NOTA
Retire las manos de la celda de flujo antes de accionar el interruptor de vacío para evitar posibles desvíos posteriores en la alineación.

3 Mueva con cuidado la palanca de la celda de flujo a la posición 1 para activar el vacío y fijar la celda de flujo en su posición. Cuando la palanca de la celda de flujo está verde, el vacío está activado.

Figura 46 Palanca de la celda de flujo en posición 1

4 Espere unos cinco segundos y, a continuación, mueva lentamente la palanca de la celda de flujo a la posición 2. Cuando el color de la palanca de la celda de flujo sea verde fijo, los distribuidores están en posición y la celda de flujo está lista para usarse.

Figura 47 Palanca de la celda de flujo en posición 2

5 Asegúrese de seleccionar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) en la pantalla Load Sequencing Flow Cell (Cargar celda de flujo de secuenciación).

Confirmación de flujo correcto

1 Seleccione la solución 5 (USB) en la lista desplegable.

2 Asegúrese de que ha introducido los siguientes valores predeterminados:
- Volume (Volumen): **250**
- Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **1500**
- Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**

3 Asegúrese de que los tubos de salida de residuos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 están en una botella de agua limpia y que los tubos 4 y 5 están en el contenedor de residuos.

4 Seleccione **Pump** (Dispensar).

5 Inspeccione visualmente la celda de flujo para comprobar si hay burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.
Si observa una presencia excesiva de burbujas, compruebe si las juntas del distribuidor están obstruidas y repita el proceso.
   a Seleccione la solución 6 (USB) para evitar agotar el USB de la posición 5.
   b Reduzca la velocidad de aspiración a 1000 y dispense otros 250 µl de USB a la celda de flujo.

6 Una vez haya confirmado un flujo correcto, seleccione **Next** (Siguiente) para continuar.

7 Asegúrese de que la palanca de la celda de flujo está de color verde y, a continuación, cierre la puerta del compartimento de la celda de flujo.

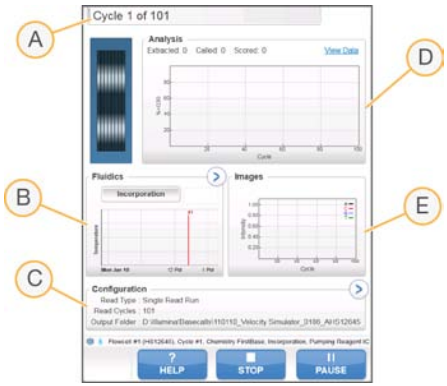
8 Confirme que las casillas de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) y **Door Closed** (Puerta cerrada) están seleccionadas y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).

9 Seleccione **Start** (Iniciar) para comenzar el experimento de secuenciación.

Monitorización del experimento

Supervise los criterios de medición del experimento que aparecen en la pantalla de resumen del experimento, la fluídica y la adquisición de imágenes.

Figura 48 Pantalla de resumen del experimento



A **Barra de progreso:** Utilice la barra de progreso para supervisar el número de ciclos que han finalizado.

B **Gráfico de fluídica:** Amplíe la sección de fluídica para supervisar los pasos de análisis químico.

C **Configuración del experimento:** Consulte los parámetros del experimento actual.

D **Gráfico de análisis:** Utilice el gráfico de análisis para supervisar las puntuaciones de calidad por ciclo.

E **Gráfico de imágenes:** Utilice el gráfico de imágenes para supervisar las intensidades por ciclo.

Informe de primera base

Si ha seleccionado la opción **Confirm First Base** (Confirmar primera base) durante la configuración del experimento, se abrirá el cuadro de diálogo de confirmación de primera base automáticamente tras finalizar la adquisición de imágenes del primer ciclo. El experimento se pone en pausa en este paso.

1 Revise el informe de primera base del cuadro de diálogo de confirmación.

2 Si los resultados son satisfactorios, seleccione **Continue** (Continuar).

Procedimientos posteriores al experimento

Una vez finalizado el experimento, descargue y pese los reactivos y, a continuación, lave el instrumento. Si desea obtener más información, consulte *Procedimientos posteriores al experimento* en la página 115.

Capítulo 5

Procedimientos posteriores al experimento

Introducción 116
Descarga y cálculo del peso de los reactivos 117
Realización de un lavado de mantenimiento 118
Realización de un lavado con agua 122
Cambio de modos de secuenciación 124
Inactividad del instrumento 126
Apagado del instrumento 127

Introducción

Los procedimientos posteriores al experimento incluyen retirar los reactivos y calcular su peso, así como lavar el instrumento. Se requiere un lavado con agua después de cada experimento, con la opción de realizar un lavado de mantenimiento en su lugar tras un experimento de rendimiento elevado. Illumina recomienda un lavado de mantenimiento.

Unos lavados regulares del instrumento garantizan un rendimiento continuado de la siguiente manera:

- Expulsa cualquier resto de reactivo y muestra de los dispensadores y tubos de la fluídica.
- Se evita la acumulación y cristalización de sales en los dispensadores y los tubos de la fluídica.
- Evita la contaminación cruzada del experimento anterior, incluida la contaminación cruzada tras cambiar de modo.

NOTA

Al final de un experimento, se debe realizar un lavado con agua para lavar el sistema y comprobar la fluídica. Al configurar un experimento, el software confirma que se ha realizado un lavado con agua o un lavado de mantenimiento durante las últimas 24 horas. Se debe realizar un lavado de mantenimiento cada diez días. Transcurridos diez días del último lavado de mantenimiento, el software le solicita que lleve a cabo un lavado de mantenimiento.

Descarga y cálculo del peso de los reactivos

1 Abra la puerta del compartimento de reactivos.

2 Levante los dispensadores de la gradilla de reactivos SBS y "paired-end" correspondientes siguiendo esta secuencia de movimiento:
   a Tire del mango del dispensador hacia fuera.
   b Levante el mango del dispensador hacia arriba mientras tira de él hacia fuera.
   c Suelte el mango del dispensador en la ranura del extremo superior del canal. Asegúrese de que el mango del dispensador se encuentre colocado de forma segura en la ranura.

3 Deslice la gradilla de reactivos hacia el exterior del compartimento de reactivos con el mango de la gradilla.

4 Retire cada botella de la gradilla de reactivos y registre el peso en el formulario de seguimiento del laboratorio.
   Visite la página de asistencia de HiSeq 2500 en el sitio web de Illumina para descargar un formulario de seguimiento de laboratorio interactivo.

5 [En el modo de experimento rápido] Extraiga los tubos de la estación de carga de bibliotecas.

ADVERTENCIA

Este grupo de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina que puede alterar la capacidad reproductora. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos puesto que puede provocar lesiones. Deseche los contenedores y el contenido no utilizado de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona. Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) de este kit en support.illumina.com/sds.html.

Realización de un lavado de mantenimiento

Se debe llevar a cabo un lavado de mantenimiento cada diez días o al cambiar entre los modos de rendimiento elevado y rápido, y de manera opcional tras cada experimento de rendimiento elevado. Illumina recomienda realizar un lavado de mantenimiento tras cada experimento de rendimiento elevado.

La pantalla Load Gasket (Cargar junta) se abre con un lavado de mantenimiento cada diez días y al cambiar del modo rápido al de rendimiento elevado. Sustituya la junta de diez puertos en el distribuidor delantero y la junta de ocho puertos en el distribuidor trasero antes de continuar con el lavado, aunque esta pantalla no aparezca.

Un lavado de mantenimiento consiste en lavar el sistema con la solución Tween 20 y ProClin 300.

Consumibles proporcionados por el usuario

- Paños humedecidos en etanol
- 8 botellas, 250 ml (Corning, n.º de catálogo 430776)
- 10 tubos, 15 ml (Corning, n.º de catálogo 430052)
- [Para el modo de experimento rápido] 1 tubo Eppendorf por cada celda de flujo para el lavado de la estación de carga
- Agua de laboratorio
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949)
- ProClin 300 (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 48912-U)

Preparación de solución de lavado

Prepare 5 litros de solución de lavado de mantenimiento para su uso con 1 instrumento. Esta solución se puede utilizar hasta 3 veces y almacenarse hasta 30 días a temperatura ambiente.

NOTA
Deseche la solución de lavado de conformidad con las normativas de seguridad oficiales de su zona.

1. Prepare 250 ml de Tween 20 al 10 % combinando los siguientes volúmenes y añadiendo el agua en primer lugar:
   - Agua de laboratorio (225 ml)
   - Tween 20 (25 ml)
2. Coloque una barra de agitación en un bidón vacío con una capacidad mínima de 6 litros.
3. Combine los siguientes volúmenes en el bidón, añadiendo agua en primer lugar:
   - Agua de laboratorio (750 ml)
   - Tween 20 al 10 % (250 ml)
   - ProClin 300 (1,5 ml)

   Estos volúmenes proporcionan el resultado de una solución de lavado de Tween 20 al 2,5 % y de ProClin 300 al 0,15 % aproximadamente.
4. Coloque el bidón en una placa de agitación y agite hasta que la solución se haya mezclado bien.
5. Añada a la solución 4 litros de agua de laboratorio. Estos volúmenes proporcionan el resultado de una solución de lavado de Tween 20 al 0,5 % y de ProClin 300 al 0,03 % aproximadamente.
6. Continúe la agitación hasta que la solución se haya mezclado bien.
7. Reserve en un contenedor cerrado a temperatura ambiente hasta que esté listo para llenar o rellenar los tubos y las botellas de reactivos con la solución de lavado.

Lavado con Tween 20 y ProClin 300

1. En la pantalla de bienvenida, seleccione **Wash** | **Maintenance** (Lavado | Mantenimiento).
2. [Para los modos de rendimiento elevado] Seleccione **Yes** (Sí) para lavar las posiciones de reactivos PE cuando el experimento de secuenciación haya incluido una lectura de indexado o un análisis PE. De lo contrario, seleccione **No**. Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar.
3. Si utiliza una solución de lavado fresca, prepare los componentes de lavado como se indica a continuación:
   a. Llene ocho botellas SBS con 250 ml de solución de lavado.
   b. Llene diez tubos PE con 12 ml de solución de lavado.

c [Para el modo de experimento rápido] Llene los tubos Eppendorf con 1,6 ml de solución de lavado y cárguelos en la estación de carga.

Si va a reutilizar una solución de lavado, rellene las botellas y los tubos guardados del lavado anterior.

4 Para la solución de lavado fresca, asigne cada botella y tubo a una posición de la gradilla de reactivos y mantenga dichas posiciones para cada lavado que se lleve a cabo posteriormente. De lo contrario, la solución de lavado podría contaminarse con los reactivos que estuvieran presentes en los dispensadores.

5 Cargue las botellas y los tubos en el instrumento en la gradilla de reactivos correcta.

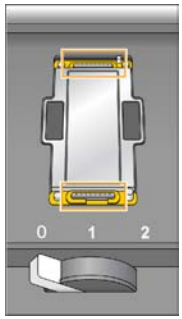
6 Seleccione la casilla de verificación **Wash solution loaded and template loading station closed** (Solución de lavado cargada y estación de carga de cadenas molde cerrada).

7 Seleccione **Next** (Siguiente).

8 Extraiga la celda de flujo de la platina de la celda de flujo y apártela hasta que esté listo para volver a cargar la misma celda de flujo antes de iniciar el lavado.

9 Con un par nuevo de guantes, ejerza una ligera presión en un extremo de la junta delantera hasta que se levante el extremo contrario. Utilice unas pinzas para coger y extraer la junta. Repita el procedimiento para retirar la junta trasera.

Figura 49 Desinstalación de las juntas usadas de los distribuidores



10 Coloque una junta nueva de diez puertos en el distribuidor delantero y una junta nueva de ocho puertos en el distribuidor trasero.

11 Vuelva a cargar la celda de flujo.

12 Asegúrese de seleccionar la casilla de verificación **Vacuum Engaged** (Vacío activado) en la pantalla Load Wash Flow Cell (Cargar celda de flujo de lavado).

13 Seleccione **Next** (Siguiente).

14 Realice una comprobación de fluídica:
   a Seleccione la solución 2 en la lista desplegable. Acepte los valores predeterminados de la bomba.
   b Seleccione **Pump** (Dispensar).
   c Inspeccione visualmente la celda de flujo para comprobar si hay burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores. Las burbujas adicionales son normales en el caso de lavado con las soluciones Tween 20 y ProClin 300 y no afectan al volumen administrado.

15 Retire los ocho tubos de residuos de la celda de flujo apropiada del contenedor de residuos. No incluya los ocho tubos de la celda de flujo opuesta ni los tubos de la bomba de condensación.

16 [Para los modos de rendimiento elevado] Agrupe los ocho tubos de residuos con papel Parafilm y asegúrese de mantenerlos todos nivelados. Introduzca los extremos de los tubos agrupados en una botella de 250 ml.

17 [Para el modo de experimento rápido] Coloque los extremos de los tubos 4 y 5 en un contenedor vacío. Coloque los extremos de todos los demás tubos en una botella de agua limpia para evitar que entre aire en las bombas de las jeringas.

18 Seleccione **Next** (Siguiente) para iniciar el lavado.

19 Una vez finalizado el lavado, seleccione **Return to Start** (Volver a iniciar).

20 Mida el volumen administrado.

NOTA
Todas las botellas y los tubos se llenan hasta su capacidad correspondiente para garantizar que los dispensadores se enjuagan. Sin embargo, el volumen administrado para cada posición varía de forma que las botellas y los tubos contienen volúmenes diferentes cuando ha finalizado el lavado.

Posiciones	Volumen administrado de la celda de flujo de rendimiento elevado	Volumen administrado de la celda de flujo rápida
8 posiciones SBS	82 ml	29 ml
10 posiciones PE	76 ml	30 ml
1 posición de biblioteca	Vacío	1,2 ml
Todas las posiciones	19,75 ml por carril	30,1 ml por carril

21 Desenvuelva los tubos de residuos y devuélvalos al contenedor de residuos.

Realización de un lavado con agua

Se requiere realizar un lavado con agua después de cada experimento de secuenciación. Tras un experimento de rendimiento elevado, puede realizar un lavado de mantenimiento en su lugar.

Realice un lavado con agua antes de empezar un nuevo experimento de secuenciación si el instrumento ha permanecido inactivo durante un día o más.

Consumibles proporcionados por Illumina

- Agua de laboratorio

Consumibles proporcionados por el usuario

- 8 botellas, 250 ml (Corning, n.º de catálogo 430776)
- 10 tubos, 15 ml (Corning, n.º de catálogo 430052)
- Agua de laboratorio
- [Para el modo de experimento rápido] Un tubo Eppendorf abatible para cada celda de flujo

Procedimiento

1. En la pantalla de bienvenida, seleccione **Wash** | **Water** (Lavado | Agua).
2. Seleccione **Yes** (Sí) para lavar las posiciones de los reactivos "paired-end". En caso contrario, seleccione **No** para lavar solo las posiciones de los reactivos SBS. Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar.
3. Cargue el instrumento con agua de laboratorio de la siguiente forma:
   a. Llene ocho botellas SBS con 20 ml de agua de laboratorio.
   b. Llene diez tubos de PE con 10 ml de agua de laboratorio.
   c. [Para el modo de experimento rápido] Llene el tubo Eppendorf con 1 ml de agua de laboratorio.
4. Asegúrese de que hay cargada una celda de flujo usada. Si es necesario, cargue una celda de flujo usada. Seleccione **Next** (Siguiente).
5. Realice una comprobación de fluídica:

a Seleccione la solución 2 en la lista desplegable. Acepte los valores predeterminados de la bomba.
b Seleccione **Pump** (Dispensar).
c Inspeccione visualmente la celda de flujo para comprobar si hay burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.

6 Retire los tubos de residuos de la celda de flujo apropiada del contenedor de residuos. No incluya los tubos de residuos de la celda de flujo opuesta ni los tubos de la bomba de condensación.

7 [Para los modos de rendimiento elevado] Agrupe los tubos de residuos con papel Parafilm y asegúrese de mantener todos los extremos nivelados. Introduzca los extremos de los tubos agrupados en una botella de 250 ml.

8 [Para el modo de experimento rápido] Coloque los extremos de los tubos 4 y 5 en un contenedor vacío. Coloque el extremo de todos los demás tubos en una botella de agua limpia para evitar que entre aire en las bombas de las jeringas.

9 Seleccione **Next** (Siguiente) para iniciar el lavado con agua.

Posiciones	Tiempo aproximado del experimento
8 posiciones SBS	20 minutos
8 posiciones SBS y 10 posiciones "paired-end"	60 minutos
[Modo de experimento rápido] 8 posiciones SBS, 10 posiciones "paired-end" y 1 posición de carga de bibliotecas	10 minutos

10 Cuando finalice el lavado, mida el volumen administrado y regístrelo en el formulario de seguimiento del laboratorio.

Posiciones	Volumen administrado
8 posiciones SBS	32 ml
8 posiciones SBS y 10 posiciones "paired-end"	72 ml
[Modo de experimento rápido] 8 posiciones SBS, 10 posiciones "paired-end" y 1 posición de carga de bibliotecas	9,5 ml por carril

11 Desenvuelva los tubos de residuos y devuélvalos a la botella de residuos.

Cambio de modos de secuenciación

Utilice el comando **Mode Select** (Selección de modo) de la pantalla de bienvenida para cambiar entre los modos de rendimiento elevado y de experimento rápido.

Únicamente se pueden realizar de forma simultánea experimentos del mismo modo. Por lo tanto, los cambios de modo se aplican tanto a la celda de flujo A como a la celda de flujo B. Si se está utilizando una de las celdas de flujo, no se puede realizar ningún cambio de modo.

Se requiere llevar a cabo un lavado de mantenimiento y cambiar la junta a la hora de cambiar entre modos de experimento. Para obtener más información, consulte *Realización de un lavado de mantenimiento* en la página 118.

Cambio del modo de rendimiento elevado al modo de experimento rápido

El cambio de un modo de rendimiento elevado (HiSeq v4 o TruSeq v3) al modo de experimento rápido requiere un lavado de mantenimiento en modo rápido.

Especificación	Lavado de mantenimiento rápido
Tipo de celda de flujo	Celda de flujo rápida (dos carriles)
Junta de celda de flujo	Junta de 8 puertos o junta de 10 puertos
Reactivos	Tween 20 y ProClin 300
Volúmenes esperados (ml)	60,2 ml
Tiempo (minutos)	60 minutos

Cambio del modo de experimento rápido al modo de rendimiento elevado

El cambio del modo de experimento rápido a un modo de rendimiento elevado (HiSeq v4 o TruSeq v3) requiere un lavado de mantenimiento en modo rápido seguido de un lavado de mantenimiento de rendimiento elevado.

Especificación	Lavado de mantenimiento rápido	Lavado de mantenimiento de rendimiento elevado
Tipo de celda de flujo	Celda de flujo rápida (dos carriles)	Celda de flujo de rendimiento elevado (ocho carriles)
Junta de celda de flujo	Junta de 8 puertos o junta de 10 puertos	Junta de 8 puertos o junta de 10 puertos
Volúmenes esperados (ml)	60,2 ml	158 ml
Tiempo (minutos)	60 minutos	130 minutos
Tiempo total de cambio de modo	~3 horas	

Inactividad del instrumento

Siga estas instrucciones para preparar el instrumento para que permanezca inactivo durante un máximo de 10 días. Para los plazos de tiempo superiores a 10 días, consulte *Apagado del instrumento* en la página 127.

1. Realice un lavado de mantenimiento completo para llenar completamente el sistema. Para obtener más información, consulte *Realización de un lavado de mantenimiento* en la página 118.
2. Deje la celda de flujo en la platina de la celda de flujo con la palanca de la celda de flujo en la posición 2. Los distribuidores quedarán levantados.
3. [Para los modos de rendimiento elevado] Cargue 10 ml de agua de laboratorio en cada posición de reactivo de las gradillas de reactivos. A continuación, sumerja los dispensadores.
4. [Para el modo de experimento rápido] Cargue 10 ml de agua de laboratorio en cada posición de reactivos de las gradillas de reactivos y 1 ml de agua de laboratorio en cada posición de la estación de carga. A continuación, sumerja los dispensadores.
5. No apague el instrumento.
6. Antes de volver a utilizar el instrumento, realice un lavado con agua. Para obtener más información, consulte *Realización de un lavado con agua* en la página 122.

Apagado del instrumento

Apague el instrumento solo si no tiene pensado utilizarlo en un periodo de diez días como mínimo. Si tiene pensado utilizar el instrumento en un periodo de diez días como máximo, consulte *Inactividad del instrumento* en la página 126.

Lleve a cabo el siguiente procedimiento para preparar de forma segura la fluídica y apagar el sistema.

1. Realice un lavado de mantenimiento para lavar el sistema. Para obtener más información, consulte *Realización de un lavado de mantenimiento* en la página 118.
2. Retire la celda de flujo de la platina de la celda de flujo.
3. Con un paño humedecido en alcohol o una toallita sin pelusa humedecida en etanol o isopropanol, limpie con cuidado la superficie del soporte de la celda de flujo hasta que esté limpia.

   PRECAUCIÓN
   Procure que no entre alcohol en los orificios de vacío ni alrededor de los distribuidores. Si es necesario, utilice una toallita de laboratorio sin pelusa para secar la platina.

4. [Para los modos de rendimiento elevado] Cargue 10 ml de agua de laboratorio en cada posición de reactivo de las gradillas de reactivos. A continuación, sumerja los dispensadores.
5. [Para el modo de experimento rápido] Cargue 10 ml de agua de laboratorio en cada posición de reactivo y 1 ml de agua de laboratorio en cada posición de la estación de carga. A continuación, sumerja los dispensadores.
6. Apague el instrumento.
7. Para reiniciar el instrumento, cargue agua en todas las posiciones de reactivos, encienda el instrumento y realice un lavado con agua. Para obtener más información, consulte *Realización de un lavado con agua* en la página 122.

Análisis en tiempo real

Capítulo 6

Introducción 130
Descripción de análisis en tiempo real 131
Supervisión de criterios de medición de experimento 134
Flujo de trabajo del análisis en tiempo real 136
Archivos de salida de secuenciación 141
Estructura de carpetas de salida 143
Numeración de placas 145
Imágenes en miniatura 146

Introducción

El software de análisis en tiempo real (RTA) realiza un análisis de las imágenes integrado en el instrumento y la llamada de bases durante un experimento de secuenciación en el instrumento HiSeq 2500, lo que ahorra un valioso tiempo en los posteriores análisis de datos.

Descripción de análisis en tiempo real

El análisis en tiempo real se ejecuta en el ordenador del instrumento, en el que realiza la llamada de bases y asigna una puntuación de calidad a cada llamada de bases.

El software realiza un seguimiento del estado de cada placa y determina cuándo se debe avanzar al siguiente paso del proceso. Cuando avanza una placa, el análisis en tiempo real genera un archivo para el paso finalizado y, a continuación, inicia el siguiente paso. Por tanto, el software puede determinar el estado de cada placa en función de los archivos que existan. Si ha finalizado el análisis en tiempo real, este guarda los datos del experimento y puede reanudar el procesamiento.

Entradas de análisis en tiempo real

El análisis en tiempo real requiere los siguientes archivos de entrada:

- Archivos de intensidad de grupos, que contienen los resultados de los análisis de imágenes.
- RunInfo.xml, que el software de control genera automáticamente al inicio del experimento. A partir de este archivo, el análisis en tiempo real lee el nombre del experimento, el número de ciclos, si una lectura ha sido indexada y el número de placas de la celda de flujo.
- HiSeq.Configuration.xml, que es un archivo de configuración del instrumento en el formato XML.
- RTA.exe.config, que es un archivo de configuración de software en formato XML.

El análisis en tiempo real utiliza los parámetros del experimento introducidos durante su configuración y recibe los comandos del software de control que incluyen información sobre cuándo iniciarlo y la ubicación de RunInfo.xml.

Salidas de análisis en tiempo real

Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo definidas como un campo de visión por la cámara. Para cada placa que se analiza, el análisis en tiempo real produce un resultado principal como un conjunto de archivos de filtro y archivos de llamadas de bases clasificadas por calidad. Otros archivos admiten la generación de archivos de salida principal.

- **Archivos de llamadas de bases:** Para cada placa que se analiza, se genera un archivo de llamada de bases comprimido (*.bcl) para cada placa por ciclo. El archivo de llamada de bases contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad asociada.
- **Archivos de filtro:** Cada placa produce información de filtro que se incluye en un archivo de filtro (*.filter) para cada placa a lo largo de todo el experimento. El archivo de filtro especifica si los grupos han superado los filtros.
- **Archivos de ubicación de grupos:** Un archivo de ubicación de grupos (*.locs) contiene las coordenadas X e Y para cada grupo de la celda de flujo.
- **Archivos de estadísticas:** Para cada ciclo, se produce un archivo de estadísticas (*.stats). El archivo de estadísticas contiene estadísticas agregadas para el ciclo.

Los archivos de resultados principales se utilizan para los análisis de datos posteriores. Utilice bcl2fastq para la demultiplexación y la conversión de los archivos .bcl en archivos FASTQ, que se pueden utilizar como entrada para la alineación. Para convertir datos desde HiSeq, utilice bcl2fastq 1.8.4 o una versión posterior.

El análisis en tiempo real proporciona criterios de medición en tiempo real de la calidad de los experimentos guardados como archivos InterOp. Los archivos InterOp son archivos binarios que contienen criterios de medición relacionados con placas, ciclos y lecturas para la visualización de criterios de medición en el visor del análisis de secuenciación. Para la visualización de los criterios de medición generados por el análisis en tiempo real, utilice el visor del análisis de secuenciación v1.8.20 o una versión posterior.

Para obtener más información, consulte *Archivos de salida de secuenciación* en la página 141.

Solución de errores de análisis en tiempo real

El análisis en tiempo real mantiene archivos de registro en la carpeta RTALogs. Si se produce un error, este se registra en un archivo de registro de error denominado *Error.txt.

NOTA
El software crea el archivo de registro de error solo si se produce un error.

Transferencia de datos

Durante el experimento, el análisis en tiempo real (RTA) copia de manera automática los datos generados a partir de los archivos de imágenes sin procesar en la ubicación especificada para la carpeta de salida. Si el análisis de imágenes se retrasa, el análisis en tiempo real (RTA) detiene el procesamiento y coloca la celda de flujo en un estado seguro. El procesamiento se reanuda cuando los datos de las imágenes están disponibles.

NOTA

Si el análisis en tiempo real (RTA) deja de funcionar, el procesamiento se reanudará automáticamente durante el siguiente ciclo, en el punto adecuado de la celda de flujo. No reinicie el análisis en tiempo real de forma manual.

Si utiliza BaseSpace, Illumina recomienda una velocidad de conexión de red mínima de 10 Mbps. Para obtener información adicional, consulte la *Guía de preparación del centro de HiSeq 2500, 1500 y 2000 (n.º de referencia 15006407_ESP)*.

La transferencia de datos finaliza cuando se genera un archivo de marcador denominado Basecalling_Netcopy_complete.txt. Uno de estos archivos se genera para cada lectura y se genera uno para todo el experimento.

Supervisión de criterios de medición de experimento

El análisis en tiempo real genera criterios de medición de calidad cuando comienza el análisis de imágenes. Sin embargo, no todos los criterios de medición están disponibles en los primeros ciclos, ya que algunos procesos requieren varios ciclos para generar datos.

Data	Ciclo
Análisis de imágenes	Después del ciclo 5. Durante los primeros cinco ciclos del experimento, el software genera una plantilla de las ubicaciones de los grupos.
Llamadas de bases	Después del ciclo 12. La llamada de bases comienza tras estimar la matriz de color en el ciclo 12.
Cálculos de hebra retrasada	Después del ciclo 25. Las correcciones en la hebra retrasada para los 25 primeros ciclos determinan el cálculo de la hebra retrasada.
Puntuaciones de calidad	Después del ciclo 25. Se genera una puntuación de calidad para las lecturas que superan el filtro de calidad. Dado que las puntuaciones de calidad requieren intensidades corregidas de futuros ciclos, la puntuación de calidad siempre sigue a la llamada de bases.
Índices de error	Después del ciclo 25. Los índices de error se generan solo cuando los grupos de PhiX están presentes y la opción **Align to PhiX** (Alinear a PhiX) se ha seleccionado durante la configuración del experimento.
Controles en línea	En el ciclo 52 de cada lectura o al final del experimento en el caso de los experimentos que cuentan con menos de 52 ciclos. Los controles en línea se generan únicamente para los métodos de preparación de bibliotecas de TruSeq.*
Recuento de índices	Después de que finalicen las lecturas de índices. El recuento de índices por carril se genera únicamente cuando se ofrece una hoja de muestras.

* El visor del análisis de secuenciación v1.8.44 y las versiones posteriores no incluyen la ficha TruSeq Controls (Controles de TruSeq), en la que el SAV informa de los resultados del análisis de los controles en línea.

Visor del análisis de secuenciación

El software del visor del análisis de secuenciación muestra los criterios de medición generados durante el experimento de secuenciación. Los criterios de medición aparecen en forma de diagramas, gráficos y tablas. El visor del análisis de secuenciación se abre automáticamente una vez que estén disponibles los criterios de medición.

Seleccione **Refresh** (Actualizar) en cualquier momento durante el experimento para ver los criterios de medición actualizados.

Para obtener información adicional, consulte la *Guía del usuario del Visor del análisis de secuenciación (SAV), n.º de referencia 15020619*.

Flujo de trabajo del análisis en tiempo real

El análisis en tiempo real y el software de control llevan a cabo el flujo de trabajo del análisis en tiempo real. El flujo de trabajo incluye los siguientes pasos:

- **Generación de plantillas:** Para asignar las ubicaciones de grupos.
- **Registro y extracción de intensidad:** Registra la ubicación de cada imagen en la celda de flujo y determina un valor de intensidad para cada grupo.
- **Corrección de la matriz de color:** Para corregir la comunicación cruzada entre canales.
- **Corrección empírica de hebras:** Para corregir los efectos de la hebra retrasada y la hebra adelantada.
- **Llamada de bases:** Para determinar una llamada de bases para cada grupo.
- **Puntuación de calidad:** Para asignar una puntuación de calidad a cada llamada de bases.

Generación de plantillas

El primer paso del flujo de trabajo es la generación de plantillas que define la posición de cada grupo en una placa mediante el uso de las coordenadas X e Y. La plantilla se utiliza como referencia en el paso siguiente de registro y extracción de intensidad.

Debido a la matriz aleatoria de grupos en la celda de flujo, la generación de plantillas requiere datos de imágenes de los primeros cinco ciclos del experimento. Tras el último ciclo de la plantilla para la adquisición de imágenes de una placa, se genera la plantilla.

Las posiciones en los grupos se escriben en un archivo de ubicación de grupos (*.locs) o en un archivo de ubicación de grupos comprimido (*.clocs) para cada placa. Para obtener más información, consulte *Archivos de salida de secuenciación* en la página 141.

Registro y extracción de intensidad

El registro y la extracción de intensidad empiezan tras generarse la plantilla de posiciones de grupo.

- El registro alinea las imágenes producidas durante cada ciclo posterior a la generación de plantillas en relación con la plantilla.
- La extracción de intensidad determina un valor de intensidad para cada grupo de la plantilla para una imagen determinada.

Si se produce un error en el registro de cualquier imagen en un ciclo, no se generará ninguna llamada de bases para esa placa en ese ciclo. Utilice el software del visor del

análisis de secuenciación para examinar las imágenes en miniatura e identificar las imágenes que no se han podido registrar. Utilice los archivos de ajuste para resolver los problemas de registro. Para obtener más información, consulte *Archivos de salida de secuenciación* en la página 141.

Corrección de la matriz de color

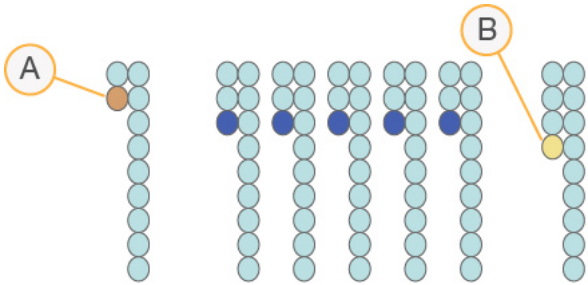
Tras el registro y la extracción de intensidad, el análisis en tiempo real corrige la comunicación cruzada entre canales. La comunicación cruzada se produce cuando un grupo muestra intensidad en el canal C y, al mismo tiempo, cierta intensidad en el canal A, por ejemplo. Mediante el uso de una matriz de color de 4 x 4, el análisis en tiempo real genera intensidades corregidas de matriz con una comunicación cruzada reducida o inexistente, y equilibra diferencias de intensidad global entre canales de color.

Corrección empírica de hebras

Durante la reacción de secuenciación, cada cadena de ADN de un grupo se amplía en una base por cada ciclo. La hebra retrasada y la hebra adelantada se producen cuando una cadena queda fuera de la fase en relación con el ciclo de incorporación actual.

- La hebra retrasada se produce cuando una base se atrasa.
- La hebra adelantada se produce cuando una base se avanza.

Figura 50 Hebra retrasada y hebra adelantada



A Lectura con una base con hebra retrasada
B Lectura con una base con hebra adelantada

El análisis en tiempo real corrige los efectos de la hebra retrasada y la hebra adelantada mediante el uso del algoritmo de corrección empírica de hebras que maximiza la calidad de datos en cada ciclo durante el experimento.

Los resultados de hebra retrasada y hebra adelantada se registran en el archivo llamado EmpiricalPhasing_[carril]_[lectura]_[placa].txt, que se encuentra en la carpeta Data\Intensities\BaseCalls\Phasing.

Llamada de bases

Tras corregir el color de las intensidades sin procesar, y corregir la hebra retrasada y la hebra adelantada, el canal de color con mayor intensidad es la llamada de bases para ese grupo en ese ciclo. La llamada de bases en el HiSeq 2500 mediante el análisis en tiempo real empieza tras el ciclo 12.

La llamada de bases determina una base (A, C, G o T) para cada grupo de una placa determinada en un ciclo específico. Las llamadas de bases se guardan en archivos de llamadas de bases (*.bcl), que son archivos binarios con 1 byte por llamada y puntuación de calidad. El archivo de llamada de bases contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad asociada. Para realizar una llamada de bases, los grupos deben superar antes el filtro de castidad. Los grupos que no superan el filtro o a los que no se puede llamar porque están sin imagen o falla el registro de imagen se etiquetan como ausencia de llamadas. La ausencia de llamadas se representa como (N).

Grupos que superan el filtro

Durante los 25 primeros ciclos de Lectura 1, el filtro de castidad elimina los grupos menos fiables de los resultados del análisis. Los grupos superan el filtro si no más de dos llamadas de base presentan un valor de castidad inferior a 0,6 en los primeros 25 ciclos. La castidad es la relación de la mayor intensidad de base dividida por la suma de la mayor intensidad de base y la segunda mayor intensidad de base. El porcentaje de grupos que superan el filtro se representa en los informes de análisis como % PF.

Los grupos se forman en una matriz aleatoria y se ubican durante la generación de plantillas. Los grupos de baja calidad se eliminan del recuento de grupos sin procesar durante la generación de plantillas, lo que genera un porcentaje relativamente mayor de grupos que superan el filtro.

Puntuación de calidad

Una puntuación de calidad, o puntuación Q, es una predicción de la probabilidad de obtener una llamada de bases incorrecta. Una puntuación Q superior implica que una llamada de bases es más fiable y, por lo tanto, la probabilidad de que sea correcta es superior.

La puntuación Q sirve como una forma concisa de comunicar probabilidades de error pequeñas. Las puntuaciones de calidad se representan como Q(X), donde X es la puntuación. En la siguiente tabla figura la relación entre la puntuación de calidad y la probabilidad de error.

Puntuación Q, Q(X)	Probabilidad de error
Q40	0,0001 (1 en 10 000)
Q30	0,001 (1 en 1000)
Q20	0,01 (1 en 100)
Q10	0,1 (1 en 10)

NOTA

La puntuación de calidad se basa en una versión modificada del algoritmo Phred. Si desea obtener más información, consulte en.wikipedia.org/wiki/Phred_quality_score.

La puntuación de calidad calcula un conjunto de predictores para cada llamada de bases y, a continuación, utiliza los valores de los predictores para determinar la puntuación Q en la tabla de calidad. Las tablas de calidad se crean para proporcionar predicciones de calidad con una precisión óptima para experimentos generados mediante una configuración de plataforma de secuenciación y versión de análisis químico específicas.

Tras determinar la puntuación Q, los resultados se registran en los archivos de llamadas de bases (*.bcl). Para obtener más información, consulte *Archivos de salida de secuenciación* en la página 141.

Agrupación de puntuaciones Q

El análisis en tiempo real agrupa las puntuaciones de calidad en rangos específicos, o grupos, y asigna un valor a cada rango. La agrupación de puntuaciones Q reduce significativamente los requisitos de espacio de almacenamiento sin que ello afecte a la precisión o al rendimiento de las aplicaciones de etapas posteriores.

La agrupación de puntuaciones Q contribuye a la eficiencia de los procesos de análisis y los requisitos de transferencia de datos asociados con el alto rendimiento de HiSeq 2500. El archivo *.bcl resultante es más pequeño porque los algoritmos de compresión pueden comprimir el archivo de modo más efectivo. La cantidad de datos que se escriben en el ordenador del instrumento y que se transfieren a la ubicación de red son menores, lo que permite que el archivo se copie de forma más rápida.

Archivos de salida de secuenciación

Tipo de archivo	Descripción del archivo, ubicación y nombre
Archivos de llamadas de bases	Cada placa analizada se incluye en un archivo de llamada de bases que contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad codificada. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Los archivos se almacenan por carpetas de ciclo para cada carril. s_[Carril]_[Placa].bcl.gz, donde el carril es el número de carril de un dígito y la placa es el número de placa de cuatro dígitos. Los archivos de llamadas de bases se comprimen mediante el uso de la compresión gzip.
Archivos de ubicación de grupos	Para cada placa, un archivo de ubicación de grupo contiene las coordenadas X e Y para cada grupo. Los archivos de ubicación de grupos son el resultado de la generación de plantillas. Data\Intensities
Archivos de filtro	El archivo de filtro especifica si un grupo ha superado los filtros. Los archivos de filtro se generan en el ciclo 26 mediante el uso de 25 ciclos de datos. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril y placa. s_[carril]_[placa].filter
Archivos InterOp	Archivos de informes binarios utilizados por el visor del análisis de secuenciación. Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento. Carpeta InterOp
Archivos de registro	Registra los eventos y se actualizan a lo largo del experimento. Data\RTALogs
Archivos de ajuste	Para cada experimento se crean dos archivos de ajuste: • offsets.txt: Contiene los ajustes de placa para cada ciclo y canal en relación con la plantilla. • SubTileOffsets.txt: Contiene el desplazamiento medido para cada cuadrante de cada imagen en relación con el marco de referencia. Data\Intensities\Offsets

Tipo de archivo	Descripción del archivo, ubicación y nombre
Archivos de hebras retrasadas	Contiene información empírica de hebras retrasadas por placa. Los archivos de hebras se crean en la primera base del ciclo de llamada de bases y se actualizan tras cada base del ciclo de llamada de bases. Data\Intensities\BaseCalls\Phasing EmpiricalPhasing_[carril]_[lectura]_[placa].txt: La placa se representa con un número de cuatro dígitos que indica la superficie, el sector y la placa.
Archivo de configuración del análisis en tiempo real	Creado al inicio del experimento, el archivo de configuración del análisis en tiempo real contiene los parámetros de configuración del experimento. Data\Intensities RTAConfiguration.xml
Archivos de estadísticas	Estadísticas creadas en la llamada de bases para cada ciclo. Data\Intensities\Basecalls\L00[X]\C[X.1]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril y una subcarpeta para cada ciclo.
Archivo de información del experimento	Indica el nombre del experimento, el número de ciclos de cada lectura, si la lectura es una lectura indexada y el número de sectores y placas de la celda de flujo. El archivo de información del experimento se crea al inicio del experimento. [Carpeta raíz] RunInfo.xml
Archivos de vistas en miniatura	Una imagen en miniatura para cada canal y placa en cada sector de cada ciclo durante la adquisición de imágenes. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril y una subcarpeta para cada ciclo. s_[carril]_[placa]_[canal].jpg: La placa se representa con un número de cuatro dígitos que indica la superficie, el sector y la placa. Consulte *Numeración de placas* en la página 145.

Estructura de carpetas de salida

- **Config:** Ajustes de configuración del experimento.
- **Data**
  - **Intensities**
    - **BaseCalls**
      - **L00[X]:** Archivos de llamadas de bases para cada carril, agregados en un archivo por ciclo.
      - **Phasing:** Archivos empíricos de hebras, un archivo por placa en cada ciclo.
    - **L00[X]:** Archivos de ubicación de grupos agregados para cada carril.
    - **Offsets:** Dos archivos de ajustes para el experimento.
    - RTAConfiguration.xml
- **Images**
  - **Focus**
    - **L00[X]:** Imágenes de enfoque para cada carril.
- **InterOp:** Archivos binarios utilizados por el visor del análisis de secuenciación.
- **Logs:** Archivos de registro que describen los pasos operativos.
- **Recipe:** Archivo de fórmulas específico del experimento con el nombre del ID del cartucho de reactivo.
- **RTALogs:** Archivos de registro que describen los eventos del análisis en tiempo real.
- **Thumbnail_Images:** Imágenes en miniatura de 9 ubicaciones de cada placa, generadas para cada ciclo y base.
- RunInfo.xml
- RunParameters.xml

Nombre y ruta de la carpeta del experimento

La carpeta del experimento es la carpeta raíz para los resultados de un experimento de secuenciación. Durante la configuración del experimento, el software le solicita que introduzca la ruta de la carpeta del experimento. De manera predeterminada, la carpeta se denomina con el siguiente formato:

AAMMDD_<Nombre del ordenador>_<Número del experimento>_<ID de la celda de flujo>

Ejemplo: 110114_SN106_0716_A90095ACXX

El número del experimento aumenta en incrementos de uno cada vez que realiza un experimento en el instrumento. El ID de la celda de flujo introducido durante los pasos de configuración del experimento se añade al nombre de la carpeta del experimento.

La carpeta del experimento se guarda en la ruta de salida especificada en la pantalla Scan (Lectura) durante la configuración del experimento. La carpeta del experimento temporal para la celda de flujo A se guarda en la unidad D: y la carpeta del experimento temporal para la celda de flujo B se guarda en la unidad E:.

Numeración de placas

La celda de flujo de rendimiento elevado de HiSeq se digitaliza en 96 placas en cada carril, inferior y superior, para cada ciclo. Cada carril tiene tres sectores con 16 placas por sector. La celda de flujo rápida se digitaliza en 64 placas. Cada carril tiene dos sectores con 16 placas por sector.

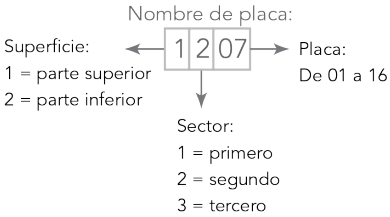
El nombre de la placa contiene un número de cuatro dígitos que representa la posición en la celda de flujo.

- El primer dígito representa la superficie:
  - 1 para la parte superior
  - 2 para la parte inferior
- El segundo dígito representa el sector:
  - 1 para el primer sector
  - 2 para el segundo sector
  - 3 para el tercer sector (según sea necesario)

NOTA
Un sector es una columna de placas dentro de un carril de la celda de flujo.

- Los últimos dos dígitos representan la placa, de 01 a 16. La numeración de las placas comienza por 01 en el extremo de salida de la celda de flujo hasta 16 en el extremo de entrada.

Figura 51 Numeración de placas



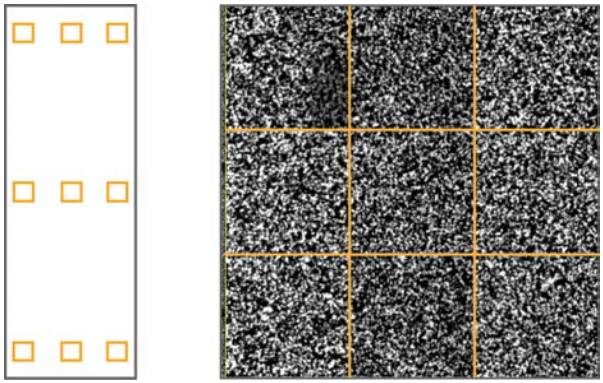
Este ejemplo indica una placa de la superficie superior de la celda de flujo, en el segundo sector y en la séptima placa.

Imágenes en miniatura

Puede configurar el software de control para generar imágenes en miniatura en formato de archivo *.jpg. Las imágenes en miniatura se generan para cada ciclo y base.

El software de control recoge imágenes de nueve secciones de una placa. Estas nueve imágenes se combinan en una imagen en miniatura y se pueden utilizar para solucionar problemas de un experimento. Las imágenes en miniatura no son aptas para el análisis de imágenes, pero se pueden utilizar para la solución de problemas.

Figura 52 Imagen en miniatura



Solución de problemas

Capítulo 7

Introducción 148
Posibles problemas de configuración de experimentos 149
Escalonamiento de experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B 151
Realización de una comprobación de fluídica 152
BaseSpace no está disponible 153
Detención y reanudación de un experimento 154
Pausa de un experimento 158
Rehibridación del cebador 160

Introducción

Esta sección describe lo que puede hacer si se produce algún problema durante un experimento de secuenciación, además de cómo realizar una comprobación de fluídica desde la pantalla Welcome (Bienvenida).

Posibles problemas de configuración de experimentos

Problema	Causa posible	Acción
El software no se ha inicializado.	El software no pudo iniciar dispositivos de hardware internos.	Cierre el mensaje de error y, a continuación, vuelva a iniciar el software del instrumento. Si el problema persiste, reinicie el ordenador del instrumento. Si va a reiniciar el ordenador, primero debe apagar el instrumento para garantizar que la unidad DoNotEject se reconoce correctamente. Si el problema persiste después de reiniciar el ordenador del instrumento, apague el instrumento, espere un mínimo de 60 segundos y, a continuación, reinicie el instrumento.
La palanca de la celda de flujo está en naranja.	La celda de flujo no se ha asentado correctamente. No se ha sellado al vacío. Los distribuidores no se elevaron.	Retire la celda de flujo y repita los pasos de limpieza. Asegúrese de que las juntas están presentes y bien asentadas. Vuelva a cargar la celda de flujo. Si los pasos anteriores no funcionan, intente sustituir las juntas y, a continuación, vuelva a cargar la celda de flujo.
La palanca de la celda de flujo parpadea en color naranja.	Se proporciona vacío pero no es adecuado.	Retire la celda de flujo y repita los pasos de limpieza. Asegúrese de que las juntas están presentes y bien asentadas. Vuelva a cargar la celda de flujo. Si los pasos anteriores no funcionan, intente sustituir las juntas y, a continuación, vuelva a cargar la celda de flujo.
La palanca de la celda de flujo parpadea en color verde.	La presión de vacío es adecuada.	Cambie la palanca de la celda de flujo a la posición 2.

Problema	Causa posible	Acción
Suministro de fluidos deficiente.	Posibles burbujas en el sistema.	Vuelva a colocar la celda de flujo y confirme que los orificios están orientados hacia ***abajo***. Busque precipitado blanco alrededor de las juntas. En caso de presencia de precipitado, cambie las juntas. Cambie siempre las juntas antes de realizar un lavado de mantenimiento del instrumento. Confirme que los dispensadores se encuentran totalmente bajados y que dichos dispensadores se encuentran en contacto con los reactivos.

Escalonamiento de experimentos en la celda de flujo A y la celda de flujo B

1 Espere a que el experimento de la celda de flujo contigua comience un análisis químico y, a continuación, seleccione **Pause** (Pausa). Se abre el menú Pause (Pausa).

NOTA
Detenga siempre el experimento actual durante un paso de química en lugar de durante un paso de adquisición de imágenes.

2 Seleccione **Normal Pause** (Pausa normal).

3 Espere a que el software realice el paso de química actual. El sistema cambia a un estado seguro de forma automática.

4 Tras poner en pausa el experimento contiguo, configure el nuevo.

5 Después de cargar la nueva celda de flujo para el nuevo experimento, cierre la puerta del compartimento.

6 Seleccione **Start** (Iniciar) para comenzar el nuevo experimento de secuenciación.

7 Seleccione **Resume** (Reanudar) en la celda de flujo contigua para reanudar el experimento detenido. El software controla automáticamente los procesos de química y adquisición de imágenes de ambas celdas de flujo.

Realización de una comprobación de fluídica

El botón Check (Comprobar) en la pantalla de bienvenida realiza una comprobación de fluídica. Utilice esta opción durante la instalación del instrumento y la solución de problemas con la fluídica.

1. Cargue una celda de flujo usada en el instrumento.
2. Cargue ocho botellas de SBS con PW1 o con agua de laboratorio y cargue las botellas en la gradilla de reactivos correspondiente. Cargue la gradilla en el instrumento.
3. Seleccione **Check** (Comprobar) en la pantalla Welcome (Bienvenida).
4. Seleccione la solución 5 (SB2) de la lista desplegable. Si va a realizar una comprobación de fluídica con la celda de flujo usada, seleccione la solución 2, que es agua.
5. Introduzca los siguientes valores predeterminados:
   - Volume (Volumen): **250**
   - [Para los modos de HiSeq v4 y TruSeq v3] Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **250**
   - [Para el modo de experimento rápido] Aspirate Rate (Velocidad de aspiración): **1500**
   - Dispense Rate (Velocidad de dispensación): **2000**
6. Seleccione **Pump** (Dispensar). Si tiene que poner en pausa la comprobación de la fluídica, seleccione **Pause** (Pausa).
7. Inspeccione visualmente la celda de flujo para comprobar si hay burbujas en los carriles o fugas cerca de los distribuidores.
   Si detecta una presencia excesiva de burbujas, compruebe si las juntas del distribuidor están obstruidas, reduzca la velocidad de aspiración a 100 y bombee otros 250 µl de agua a la celda de flujo.

BaseSpace no está disponible

Si BaseSpace no está disponible, abra Servicios de Windows para asegurarse de que BaseSpace Broker se haya iniciado. Si no se ha iniciado, reinícielo. Si los servicios se están ejecutando y BaseSpace aún no está disponible, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

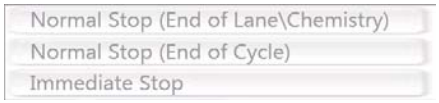
Detención y reanudación de un experimento

Puede que sea necesario detener un experimento si no se configuró correctamente, si la calidad de los datos es deficiente o si se ha producido un error en el hardware. Para reanudar un experimento detenido, asegúrese de que selecciona las opciones de detención adecuadas que permitan la reanudación del experimento.

Opción de detención	Opción de análisis en tiempo real	¿Se puede reanudar?
Normal Stop (End of Lane\Chemistry) (Detención normal [Final de carril\química])	Keep As Is (Dejar tal cual)	Sí. El experimento se reanuda con el siguiente comando de adquisición de imágenes o de la siguiente química.
	Complete For Run (Completo para experimento)	No. El experimento no se puede reanudar.
	Complete For Read (Completo para lectura)	Sí. El experimento se reanuda al comienzo de la siguiente lectura.
Normal Stop (End of Cycle) (Detención normal [Final de ciclo])	Keep As Is (Dejar tal cual)	Sí. El experimento se reanuda en el siguiente ciclo.
	Complete For Run (Completo para experimento)	No. El experimento no se puede reanudar.
	Complete For Read (Completo para lectura)	Sí. El experimento se reanuda al comienzo de la siguiente lectura.
Immediate Stop (Detención inmediata)	No option (No hay opción)	No.

1 Desde la pantalla Run Overview (Resumen del experimento), seleccione **Stop** (Detener). El menú de detención se abre.

Figura 53 Detención del experimento



2 Seleccione una de las siguientes opciones de detención:

3 Seleccione una opción de detención:
- **Normal Stop (End of Lane\Chemistry)** (Detención normal [Final de carril/química]): Detiene solo el experimento después de que se haya finalizado la química actual o el comando de procesamiento de imágenes y, a continuación, coloca la celda de flujo en un estado seguro.
- **Normal Stop (End of Cycle)** (Detención normal [Final de ciclo]): Detiene solo el experimento después de que se haya finalizado el ciclo actual y, a continuación, coloca la celda de flujo en un estado seguro.
- **Immediate Stop** (Detención inmediata): Detiene el experimento sin finalizar la operación actual y ***no*** coloca la celda de flujo en un estado seguro. No puede reanudar un experimento que se detuvo con la opción de detención inmediata.

4 Seleccione una de las siguientes opciones de análisis en tiempo real:
- **Keep As Is** (Dejar tal cual): El experimento se detiene sin ninguna modificación en el análisis en tiempo real. El experimento puede reanudarse desde donde se ha detenido.
- **Complete For Run** (Completo para experimento): El análisis en tiempo real se detiene. La información del experimento, los parámetros del experimento y los archivos de la fórmula se actualizan para reflejar el total de ciclos cuando finalizó el último ciclo. A continuación, el análisis en tiempo real se reinicia para finalizar la llamada de bases del experimento hasta el punto en que este último se detuvo. El experimento no se puede reanudar.
- **Complete For Read** (Completo para lectura): El análisis en tiempo real se detiene. La información del experimento, los parámetros del experimento y los archivos de la fórmula se actualizan para recortar la longitud de la lectura actual hasta el último ciclo completado. Esto no afectará a las lecturas posteriores. A continuación, el análisis en tiempo real se reinicia para finalizar el análisis de la lectura actual. El experimento se puede reanudar al comienzo de la siguiente lectura.

5 Tras detener el experimento, seleccione **Return to Start** (Volver a iniciar) en la pantalla Run Overview (Resumen del experimento). Se abre la pantalla Welcome (Bienvenida).

Reanudación de un experimento detenido

Se puede reanudar un experimento únicamente si se detuvo de forma segura con la detención normal con una de las opciones de análisis en tiempo real que permiten reanudar el experimento.

NOTA
Si en la parte contigua se está realizando una generación de grupos o la secuenciación química "paired-end", el experimento no se reanudará hasta que haya finalizado el proceso en curso.

1 En la pantalla Welcome (Bienvenida), seleccione **Sequence** (Secuenciar) y, a continuación, seleccione **Resume Run** (Reanudar experimento). Se abre la pantalla Resume (Reanudar).

2 Seleccione la carpeta del experimento correspondiente en la lista desplegable.

NOTA
El software reanuda el experimento en el punto en que se detuvo y se establece de manera predeterminada la configuración correcta en la pantalla Resume (Reanudar).

3 Confirme la configuración en la pantalla Resume (Reanudar) o seleccione el punto adecuado en el que desea reanudar el experimento.
- **Resume At** (Reanudar en) enumera la lectura o el punto en que se va a reanudar el experimento.
- **Start At Cycle** (Comenzar en ciclo) muestra el ciclo que se va a reanudar.

PRECAUCIÓN
Illumina no recomienda reanudar un experimento en el momento de procesamiento de "paired-end", excepto para la rehibridación del cebador de la Lectura 2.

4 Confirme la configuración en la pantalla Resume (Reanudar) o seleccione los comandos de química y las imágenes que desea reanudar. Para obtener más información, consulte *Configuración de ejemplo para reanudar un experimento* en la página 156.

5 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar. El software le guiará a través de los pasos restantes de configuración del experimento.

Configuración de ejemplo para reanudar un experimento

Si se ha detenido el experimento tras la adquisición de imágenes del carril 1 en el ciclo 23, el software define automáticamente los ajustes de reanudación del experimento de la Lectura 1 en el ciclo 23. El sistema muestra los siguientes ajustes en la pantalla Resume (Reanudar):

- **Resume At: (Reanudar en:)** Read #1 (Lectura 1)
- **Start At Cycle: (Comenzar en ciclo:)** 23

Figura 54 Ejemplo de reanudación del ciclo 23

Dado que el experimento en este ejemplo se detuvo durante un paso de adquisición de imágenes, **Imaging (no chemistry)** (Imágenes [sin química]) se selecciona automáticamente.

Pausa de un experimento

PRECAUCIÓN
No ponga en pausa un experimento durante la adquisición de imágenes. Utilice la detención normal, finalice el ciclo o complete la función de carril para detener y reanudar un experimento.

Ponga en pausa un experimento desde la pantalla Run Overview (Resumen del experimento). Puede que sea necesario poner en pausa un experimento para comprobar sus componentes, tales como los volúmenes de reactivos, antes de continuar. En condiciones normales, no es necesario poner en pausa un experimento.

1 En la pantalla Run Overview (Resumen del experimento), seleccione **Pause** (Pausa). El menú de pausa se abre.

Figura 55 Opciones de pausa

2 Seleccione **Normal Pause** (Pausa normal).

3 Seleccione **Yes** (Sí) para confirmar el comando de pausa. El software finaliza la química actual o el comando de procesamiento de imágenes y coloca la celda de flujo en un estado seguro.

4 Seleccione **Resume** (Reanudar) para reanudar el experimento.

Cambio de reactivos durante un experimento

Si comenzó su experimento con un volumen parcial de reactivos, utilice la función de cambio de reactivos para poner en pausa su experimento y volver a llenar los reactivos.

1 En la pantalla Run Overview (Resumen del experimento), seleccione **Pause** (Pausa). El menú de pausa se abre.

2 Seleccione **Change Reagents** (Cambiar reactivos).

3 Seleccione **Yes** (Sí) para confirmar el comando de pausa. El software finaliza el análisis químico o el comando de adquisición de imágenes en curso, coloca la celda de flujo en un estado seguro y abre la pantalla Reagents (Reactivos).

4 En la pantalla Reagents (Reactivos), introduzca los siguientes parámetros de reactivo:
- El ID del kit de reactivos de los nuevos reactivos.

- El número de ciclos que se espera que duren los reactivos.

NOTA
La casilla de verificación del cebado se desactiva en la pantalla Change Reagents (Cambiar reactivos). No es necesario realizar el cebado.

5 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar con la carga de reactivos.

Rehibridación del cebador

El experimento de rehibridación repite el paso de secuenciación de hibridación del cebador. Si los criterios de medición del experimento arrojan números bajos de grupos, intensidades bajas de grupos u otros, realice una rehibridación del cebador para recuperar la celda de flujo. La rehibridación del cebador no daña a los grupos de la celda de flujo.

Celda de flujo de HiSeq v4

Todos los pasos de la rehibridación se realizan en el HiSeq 2500. El kit incluye cebadores para Lectura 1, Lectura de índice 1, Lectura de índice 2 para celdas de flujo de lectura individual y Lectura 2.

Nombre del kit de rehibridación	Instrucciones sobre el flujo de trabajo
HiSeq Multi-Primer Rehyb Kit v4 N.º de catálogo GD-403-4001	*HiSeq Primer Rehybridization Guide (Guía de rehibridación del cebador de HiSeq), n.º de referencia 15050105*

Celda de flujo de HiSeq v3

La rehibridación del cebador de Lectura 1 se realiza en el cBot. El kit incluye una placa de reactivos de cBot que contiene el cebador de secuenciación de Lectura 1 HP6. Para las bibliotecas de Nextera, utilice HP10 de la caja TruSeq Dual Index Sequencing Primer Box.

Nombre del kit de rehibridación	Instrucciones sobre el flujo de trabajo
TruSeq v2 cBot Multi-Primer Rehyb Kit N.º de catálogo GD-304-2001	*Read 1 Primer Rehybridization on the cBot (Rehibridación del cebador de Lectura 1 en cBot), n.º de referencia 15018149*

Celda de flujo rápida

Todos los pasos de la rehibridación se realizan en el HiSeq 2500. El kit incluye cebadores para Lectura 1, Lectura de índice 1, Lectura de índice 2 para celdas de flujo de lectura individual y Lectura 2.

Nombre del kit de rehibridación	Instrucciones sobre el flujo de trabajo
HiSeq Rapid Rehyb Kit N.º de catálogo GD-404-1001	*HiSeq Rapid Run Primer Rehybridization (Rehibridación del cebador mediante experimento rápido de HiSeq), n.º de referencia 15059379*
TruSeq Rapid Rehyb Kit N.º de catálogo GD-402-2001	*TruSeq Rapid Run Primer Rehybridization (Rehibridación del cebador mediante experimento rápido de TruSeq), n.º de referencia 15039627*

Índice alfabético

%

% PF 138

A

análisis en tiempo real
  agrupación de puntuaciones Q 139
  archivos de entrada 131
  archivos de registro 141
  archivos de salida 131, 141
  con experimento detenido 154
  corrección de matriz de color 137
  criterios de medición de experimento 134
  experimento detenido, reanudación automática 132
  hebra retrasada 137
  puntuación de calidad 139
  resultados 141
apagado del instrumento 127
apagar instrumento 127
archivo de configuración, análisis en tiempo real 131, 142
archivo RTA.exe.config 131
archivos de estadísticas 131
archivos de filtro 131, 141
archivos de llamadas de bases 131, 141
archivos de registro, análisis en tiempo real 141
archivos de salida 141
  llamadas de bases 131
  ubicaciones de grupos 131
archivos InterOp 131, 142
archivos locs 141
asistencia al cliente 167
asistencia técnica 167
ausencia de llamadas 138
ayuda
  documentación 19

B

BaseSpace
  hoja de muestras 28, 59
  hojas de muestras 16

C

carga de celda de flujo
  burbujas, fugas 38, 45, 68, 75
  celda de flujo para secuenciación 43, 73
carga de reactivos 31, 33
  pesaje 30
  posiciones de SBS 30
  tapas de embudo 30
cargar celda de flujo
  cebar celda de flujo 36, 66
cargar reactivos 80, 96
  consumibles 30
  PW1 en posición 2 30
carpeta de salida
  ubicación predeterminada 13
cebado
  preparación 39, 69, 105
  volumen de residuo 105
cebar
  volumen de residuos 39, 69
celda de flujo
  cargar 41, 71, 106
  grupos que superan el filtro 138
  ID de celda de flujo 89
  ID de la celda de flujo 26, 56, 91
  limpiar 43, 73, 108
  matriz aleatoria 138
  numeración de placas 145
  palanca 36, 43, 66, 73, 102, 108
  solución de problemas 149
  soporte de celda de flujo 34, 64, 101

celda de flujo de tramas
    posiciones de grupo 136
ciclos, supervisar 47, 77, 112
compartimento de fluídica 3
compartimento de la celda de flujo 3, 5
compartimento de reactivos 3-4
componentes
    compartimento de fluídica 3
    compartimento de la celda de flujo 3, 5
    compartimento de reactivos 3-4
    módulo óptico 3
compresión de datos 139
comprobación del sistema 10
comunicación cruzada 137
configuración del experimento
    carga de celda de flujo 43, 73
    confirmar el flujo correcto 38, 45, 68, 75
confirmar el flujo correcto, valores predeterminados 38, 45, 68, 75
consumibles
    kits de secuenciación de Illumina 22, 50, 84
    proporcionados por el usuario 17
consumibles para secuenciación 22, 50, 84
consumibles proporcionados por el usuario 17
corrección de matriz de color 137

D

detención de un experimento 154
detención normal 154
doble indexación
    configuración en pantalla de fórmulas 27, 58, 93
    en celda de flujo "paired-end" 27, 58, 93
documentación 19, 167

E

empírico de hebras 137
errores y advertencias
    iconos de estado 12
escala Phred 139
espacio en disco, comprobar 15
esquema de indexación 28, 59
estadísticas
    archivos 131
estado del instrumento 13
experimentos escalonados 151
extracción de intensidad 136

F

filtro de castidad 138
fluídica, solución de problemas 149, 152
flujo de trabajo
    experimentos escalonados 151
formación en línea 19

G

generación de plantillas 136
grupos que superan el filtro 138

H

hebra adelantada 137
hebra retrasada 137
hoja de muestras
    BaseSpace 28, 59
    resumen 16

I

icono de alerta de estado 12
iconos
    alerta de estado 12
    errores y advertencias 12
imágenes
    guardar muestras de imágenes 26, 56, 91
    supervisar 47, 77, 112
    vistas en miniatura 26, 56, 91, 142
inactividad del instrumento 126
incorporación de primera base 47, 77, 112
    confirmación 27, 57, 92
    ubicación de informe 27, 57, 92
indicadores de actividad 11
indicadores de sensor 11
informe de primera base 47, 77, 112
informes
    incorporación de primera base 27, 47, 57, 77, 92, 112

intensidades de grupo 47, 77, 112, 137

L

lavado
  lavado de mantenimiento 118
lavado con agua 10, 122
  consumibles 122
  duración 122
lavado de mantenimiento 10, 118
  duración 124-125
lavado del instrumento 118
lavados
  lavado con agua 122
  solución de lavado de mantenimiento
    preparar 119
llamada de bases
  ciclo 12 138
  puntuación de calidad 138

M

modos
  cambio 124
modos de cambio 124
modos de secuenciación
  cambio 124
módulo óptico 3
mostrar archivo de registro 13

N

nombre de experimento 26
numeración de placas 145

P

página de estado 47, 77, 112
palanca de celda de flujo
  posición 1 36, 43, 66, 73
  posición 2 36, 43, 66, 73
palanca de la celda de flujo
  posición 0 34, 64, 101
pantalla de bienvenida 9
  comandos 10
  menú 13
pantalla de configuración de la celda de flujo 26, 56, 91
pantalla de fórmula 89
pantalla de lectura 89
pantalla de reactivos 29, 59, 94
pantalla de revisión de la configuración del experimento 89
pasos de análisis químico, supervisar 47, 77, 112
pesaje de reactivos
  antes del experimento 30
pesar reactivos
  después del experimento 117
posición de los reactivos
  indexación 62
posiciones de los reactivos
  paired-end 80
posiciones de reactivo
  SBS 30
posiciones de reactivo SBS 30
posiciones de reactivos
  paired-end 31, 33
probabilidad de error 139
puntuaciones de calidad 139
  agrupación 139
  generar 134
puntuaciones Q 139

R

reactivos
  carga 31, 33
  cargar 62, 80
  cargar, ICB 81
  cargar, SBS 96
  cebado 105
  cebar 39, 69
  descargar 117
  paired-end 31, 33, 80
  pantalla de reactivos 29, 59, 94
  registrar ID del kit 29, 59, 94
registro, ubicaciones de grupo 136
RunInfo.xml 141-142

S

sector 26, 56, 91
secuenciación indexada
  reactivos, cargar 62
secuenciación paired-end
  reactivos, carga 31, 33
  reactivos, cargar 80
servidor LIMS 13

software
acerca de, versión 13
análisis en tiempo real 9
control de HiSeq 15
Experiment Manager 16
inicialización 7
mostrar archivo de registro 13
pantalla de bienvenida 9
software de control de HiSeq 9
solución de problemas 149
ver pantalla completa 13
visor del análisis de secuenciación 9
software bcl2fastq 131
software de análisis en tiempo real 9
software de control de HiSeq 9, 15
solución de lavado de mantenimiento
almacenar 118
desecho 118
preparar 119
solución de problemas 149
cargar la celda de flujo 149
fluídica 152
registro 136
soporte de celda de flujo
pasadores guía 36, 66
ubicaciones de los orificios de vacío 34, 64, 101
soporte de la celda de flujo
pasadores guía 43, 73
supervisar el experimento 47, 77, 112

T

técnica, ayuda 167

U

ubicación de generación de grupos
archivos 141
ubicación de grupos
archivos 131
generación de plantillas 136
ubicaciones de carpetas, configuración predeterminada 13
unidad DoNotEject 7

V

visor de análisis de secuenciación
archivos InterOp 131
visor del análisis de secuenciación 9
descripción general 135
volúmenes esperados 122

Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Tabla 16 Información de contacto general de Illumina

Dirección	5200 Illumina Way San Diego, CA 92122, EE. UU.
Sitio web de	www.illumina.com
Correo electrónico	techsupport@illumina.com

Tabla 17 Números de teléfono del Servicio de asistencia al cliente de Illumina

Zona	Número de contacto	Zona	Número de contacto
Norteamérica	1.800.809.4566	Irlanda	1.800.812949
Alemania	0800.180.8994	Italia	800.874909
Austria	0800.296575	Noruega	800.16836
Bélgica	0800.81102	Países Bajos	0800.0223859
Dinamarca	80882346	Reino Unido	0800.917.0041
España	900.812168	Suecia	020790181
Finlandia	0800.918363	Suiza	0800.563118
Francia	0800.911850	Otros países	+44.1799.534000

Hojas de datos de seguridad

Las hojas de datos de seguridad (SDS) están disponibles en el sitio web de Illumina en support.illumina.com/sds.html.

Documentación del producto

La documentación del producto en PDF está disponible para su descarga en el sitio web de Illumina. Vaya a support.illumina.com, seleccione un producto y, a continuación, haga clic en **Documentation & Literature** (Documentación y literatura).

Illumina
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com